

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# SKY-Analysen zur Detektion wiederkehrender Markerchromosomen beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Fenja Rohwer**

aus Kiel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Norbert Arnold, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie*

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29.04.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1. Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ursachen und Risikofaktoren	1
1.1.3. Klinik und Diagnostik	3
1.1.4. Pathologische Diagnostik	4
1.1.5. Therapie und Verlauf	5
1.1.6. Neue Entwicklungen im Bereich der gezielten Krebstherapie	8
1.2. 24-Farben Karyotypisierung/SKY	10
1.3. Zielsetzung der vorgelegten Arbeit	13
<b>2. <u>Material</u></b>	<b>14</b>
2.1. Arbeitsgeräte	14
2.2. Materialien	14
2.3. Gebrauchsfertige Lösungen und Chemikalien	15
2.4. Herzustellende Lösungen	16
2.5. Vorbereitung SKY-Hybridisierungsprotokoll	17
2.5.1. Tag 1	17
2.5.2. Tag 2	17
2.6. Cad kit	18
2.7. Zellkulturen	18
2.8. Chromosomenpräparation	19
<b>3. <u>Methoden</u></b>	<b>21</b>
3.1. Auswahl der Chromosomenpräparationen	21
3.2. DNA-Suspension	23
3.3. STR-Marker	25
3.4. SKY-Hybridisierungsprotokoll	28
3.4.1. Tag 1	29
3.4.1.1. Pepsinverdau	29
3.4.1.2. Chromosomendenaturierung	29
3.4.1.3. Sondendenaturierung- und hybridisierung	29

3.4.2. Tag 2	31
3.4.2.1. Detektion	31
3.5. Auswertung mit SKY-Vision II	31
3.6. Erstellung der SKY-Ideogramme	32
3.7. Statistik	33
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1. Auswertung der Ergebnisse am Beispiel von Patientin 1	35
4.2. Häufigkeitsverteilung	41
4.3. Korrelation mit der Platinsensibilität	42
<b>5. Diskussion</b>	<b>48</b>
5.1. Bewertung der eigenen Ergebnisse	48
5.2. Effektivität und Reliabilität SKY	50
5.3. Vergleich mit anderen Verfahren	53
5.4. Ausblick	57
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>68</b>
8.1. FIGO Klassifikation	68
8.2. ISCN	70
8.3. Ergebnisse Patientin 2-9	71
<b>9. Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>10. Curriculum Vitae</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Array-CGH	Array-based Comparative Genomic Hybridization
ASI	Applied Spectral Imaging Ltd., Migdal, Ha'Emek, Israel
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BRCA	<i>breast cancer gene</i>
CA-125	Cancer Antigen - 125
CAD-Kit	Concentrated Antibodies Detection-Kit
CCD	charge-coupled device, Bildsensor
Cot	Cyclooctatetraen, DNA-Ligand für Cot-1 DNA
CT	Computertomographie
Cy2	Fluoreszenzfarbstoff
Cy3	Fluoreszenzfarbstoff
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff
Cy5.5	Fluoreszenzfarbstoff
DAPI (-Reagent)	4',6-Diamidin-2-phenylindol
del	Deletion, Verlust eines DNA-Abschnitts
der	Derivat oder Derivatchromosom, strukturell verändertes Chromosom, das anhand seines Zentromers seinem Ursprungschromosom zugeordnet wird
DNA	deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

ED	Erstdiagnose, meist mit Lebensalter oder Jahr angegeben
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	fluorescence in situ hybridization
HBOC	hereditary breast ovarian cancer syndrome
HGSOC	high grade serous ovarian carcinoma
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome
Inversion (i)	DNA-Doppelstrangbruch mit um 180° gedrehtem Genabschnitt
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature
LGSC	low grade serous carcinoma
MRT	Magnetresonanztomographie
p-Arm (p)	kurzer Arm des Chromosoms, nach ISCN oberhalb des Zentromers dargestellt
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCOS	polycystic ovary syndrom
PCR	polymerase chain reaction
q-Arm (q)	langer Arm des Chromosoms, nach ISCN unterhalb des Zentromers dargestellt
RKI	Robert Koch-Institut
RGB	additiver Farbraum der drei Grundfarben (rot, grün, blau)

rpm	rounds per minute (Zentrifugengeschwindigkeit)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
SKOV-3	humane ovarielle Adenokarzinom-Zelllinie
SKY	Spectral Karyotyping
SOP	Standard Operating Procedure, Standardvorgehensweise als verbindliche textliche Beschreibung der Abläufe bei kritischen Vorgängen
STIC	serous tubal intraepithelial carcinoma
STR	Short Tandem Repeat
SSC	Standard Sodium Citrate
targeted therapy	gezielte Krebstherapie
Texas Red	Fluoreszenzfarbstoff
TIC	tubal intraepithelial carcinoma
TNM-Klassifikation	Stadieneinteilungssystem für Tumoren
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
X <sup>2</sup> -Test	Chi-Quadrat-Test nach Pearson (Pearson 1992)

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom oder Eierstockkrebs ist eine bösartige Entartung der Eierstöcke und ist nach ICD mit der Diagnose C56 verschlüsselt.

### 1.1.1. Epidemiologie

Nach Angaben des Instituts für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut erkrankten 7250 Frauen in Deutschland im Jahr 2014 an einem Ovarialkarzinom. Somit erkrankt statistisch betrachtet eine von 71 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom, was ein Lebenszeitrisiko von 1,5 % bedeutet. Die Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes wird nach wie vor von den Herz-Kreislauf-Erkrankungen angeführt, gefolgt von Krebserkrankungen als zweithäufigste Todesursache. Hierunter sterben Frauen am häufigsten am Mammakarzinom, gefolgt vom Kolorektalenkarzinom und dem Bronchialkarzinom. Das Ovarialkarzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor des weiblichen Reproduktionstraktes nach dem Endometriumkarzinom und hat trotz umfangreicher wissenschaftlicher Anstrengungen eine unverändert hohe Mortalität. Im Jahr 2014 starben 5354 Frauen an den Folgen eines Ovarialkarzinoms und die relative 5-Jahres-Überlebensquote ist mit 41 % entsprechend niedrig. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren (RKI 2016). Deutlich jüngere Frauen sind meist ursächlich von einer genetischen Prädisposition betroffen.

### 1.1.2. Ursachen und Risikofaktoren

Grundsätzlich wird zwischen dem hereditären und dem sporadisch auftretenden Ovarialkarzinom unterschieden: Bisher konnten diverse genetische Aberrationen mit unterschiedlicher Penetranz für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden. Am bekanntesten und häufigsten seien hier das „hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome“, kurz HNPCC, sowie das „hereditary breast ovarian cancer syndrome“, kurz HBOC genannt, wobei letzteres, neben anderen, mit den seit langem und insgesamt wissenschaftlich umfangreich analysierten *BRCA1/2*-Genen assoziiert ist. Kriterien für die Beratung zur Möglichkeit einer genetischen Testung werden von den Fachgesellschaften ständig weiterentwickelt und sehen bei bestimmten familiären Risikokonstellationen eine genetische Beratung, Testung



sowie die Möglichkeiten zu intensivierten Früherkennungsuntersuchungen bis hin zu prophylaktischen Operationen vor. Zum Beispiel haben Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation bis zum 69. Lebensjahr ein kumulatives Risiko von 39 % an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Bei einem gleichzeitig bestehenden Risiko für die Erkrankungen an einem Mammakarzinom von 46-65 %, besteht hier die Möglichkeit intensiver Früherkennung durch Mammographie-Screenings, Ultraschall- sowie MRT-Untersuchungen. Hierzu werden umfangreiche Empfehlung in der aktuellen S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms dargestellt (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher auch für Hochrisikokonstellationen wie das Vorliegen einer *BRCA1*-Mutation kein Screening für das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms empfohlen werden. Buys et al. konnten in der groß angelegten vergleichenden PLCO-Studie (the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Randomized Controlled Trial) keinen Vorteil einer regelmäßigen Vorsorgeuntersuchung durch transvaginale Sonographie oder Bestimmung des CA-125 im Serum für Morbidität und Mortalität nachweisen (Buys et al. 2011). Die Deutsche Krebsgesellschaft konnte in der aktuell gültigen S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“ für Patientinnen mit nachgewiesener *BRCA1/2*-Mutation keine eindeutige Empfehlung für die prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie aussprechen (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Lediglich die Tubenligatur selbst führt bei den häufigsten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms zu einer starken Risikoreduktion für das anschließende Auftreten eines Ovarialkarzinoms (Sieh et al. 2013). Dies ist vermutlich durch die Entfernung bzw. der Vermeidung der Entstehung von serösen tubaren intraepithelialen Karzinomen (STIC) erklärlich, welche als potentielle Vorläufer des high-grade serösen Ovarialkarzinoms (HGSOC) angesehen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2019), (Carlson et al. 2008). Außerdem spielt, gemäß aktueller Studien (Iavazzo et al. 2016), vermutlich die Verhinderung einer frühen Aussaat von Tumorzellen über den offenen Fimbrientrichter in die Bauchhöhle mit frühzeitiger Ausbildung einer Peritonealkarzinose eine Rolle.

Im Bereich der sporadisch entstehenden Ovarialkarzinome, d.h. ohne zu Grunde liegende genetische Aberration, sind insbesondere Risikofaktoren wie Alter, Übergewicht und das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) zu nennen. An hormonellen Einflussfaktoren sind beispielsweise Kinderlosigkeit und Unfruchtbarkeit

als Risikoerhöhend einzustufen (RKI 2016). Außerdem sind eine Endometriose-Erkrankung (Pearce et al. 2012) sowie eine Hormonersatztherapie (Morch et al. 2009) prädisponierend. Neuere Studien legen einen enorm reduzierenden Einfluss von oralen Kontrazeptiva auf die Inzidenz von Ovarialkarzinomen nahe. Insgesamt wird vermutet, dass zukünftig weltweit 30 000 Neuerkrankungen pro Jahr durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva verhindert werden (Beral et al. 2008).

### **1.1.3. Klinik und Diagnostik**

Eines der insgesamt größten Probleme in der Verbesserung der Prognose von Ovarialkarzinom-Patientinnen besteht nach wie vor darin, dass die meisten Tumoren erst spät und in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. So werden 60 % erst im Stadium T3 bzw. 75 % in einem Stadium FIGO IIIc bis IV (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) erkannt (RKI 2016). Zu den Einteilungskriterien nach FIGO, welche im klinischen Gebrauch unter Gynäkologen die geläufigste ist, erschien im Jahr 2014 eine systematische klinische Zusammenfassung (Mutch und Prat 2014). Aus Gründen der Vereinheitlichung mit anderen Tumorentitäten soll jedoch der pathologische Begutachtungsbericht der TNM Klassifikation folgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Die Kriterien der aktuellen FIGO und TNM Klassifikation finden sich im Anhang unter 8.1. Tabelle 7 und 8.

Die späte Erstdiagnose ist vorrangig auf die sehr unspezifische Symptomatik von unklaren abdominellen Beschwerden mit Schmerzen, Druck- und Völlegefühl, Blähungen und Zunahme der Miktionsfrequenz zurückzuführen. Ein systematisches Review konnte zeigen, dass vermutlich über 93 % der Patientinnen vor Diagnose solche unspezifischen Beschwerden hatten (Bankhead et al. 2005). Daher empfiehlt die Deutsche Krebsgesellschaft konsensbasiert insbesondere bei Frauen nach dem 50. Lebensjahr bei Auftreten solcher Beschwerden eine gynäkologische Untersuchung sowie eine transvaginale Sonographie durchzuführen (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). In der weiterführenden apparativen Diagnostik konnte keine Schnittbildgebung ein operatives Staging ersetzen (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Zur Verfügung stehen hier MRT, CT und FDG-PET. Die entsprechenden Verfahren können mit unterschiedlich hoher Sensitivität und Spezifität zum Beispiel das Vorliegen einer Peritonealkarzinose bzw. eine Infiltration

verschiedener Nachbarorgane nachweisen, erreichten aber keinen ausreichend hohen positiven prädiktiven Wert für die Vorhersage der (un-)vollständigen operativen Zytoreduktion, welche maßgeblich Prognose entscheidend ist (Gemer et al. 2009).

#### **1.1.4. Pathologische Diagnostik und Klassifikation**

In der neuen S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren (Leitlinienprogramm Onkologie 2019) wurden entsprechende Änderungen in der WHO-Klassifikation und der TNM-Klassifikation nach UICC übernommen. In dem folgenden Abschnitt wird die neue Einteilung und histologische Aufarbeitung von Ovarialkarzinomen zusammenfassend dargestellt. Ferner werden Unterschiede zur veralteten Einteilung, welche für die Auswahl der Patientinnen und ihrer Zellkulturen im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde, erläutert.

Nach neuer Einteilung werden Tumoren von Ovar, Tube und Peritoneum zusammen erfasst, da sie der gleichen Histopathologie und Genese unterliegen. Sie werden nur Anhand eines Suffixes sowohl bei der TNM- als auch bei der FIGO-Klassifikation (s. 8.1. Tabelle 8) unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellkulturen im Jahr 2013/2014 ausgewählt. Da hierbei noch zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen unterschieden wurde, wurden nur Präparate des Ovars ausgewählt, andere Präparate wurden nicht berücksichtigt.

Die histopathologische Einteilung wurde in der neuen Leitlinie ebenfalls verändert. Bei den in dieser Arbeit vorliegenden Präparaten wurde nur zwischen serösem, serös-papillärem und muzinösen Tumoren unterschieden. Alle anderen diversen Entitäten wie beispielweise endometrioiden Tumoren sowie Brenner- und Borderline-Tumoren wurden nicht eingeschlossen, sie kommen allerdings auch wesentlich seltener vor und waren entsprechend in der Datenbank des Onkologischen Labors der Frauenklinik deutlich unterrepräsentiert.

Die aktuelle Einteilung für die sehr häufigen serösen Karzinome sieht vor, diese histomorphologisch in low-grade (LGSC) und high-grade (HGSC) anhand von Kernanaplasie und Mitoserate einzuteilen. Ferner werden in der neuen WHO-Klassifikation beim Ovar sero-muzinöse, klarzellige, endometrioiden, malignen Brennertumoren, undifferenzierte Tumoren und gemischt epithelial-mesenchymale Tumoren wie das Karzinosarkom unterschieden. Die Graduierung ist beschränkt

darauf, die häufigen serösen Karzinome entsprechend ihrer neuen Einteilung in low und high grade in G1 und G3 zu erfassen.

Endometrioides Karzinome werden analog zum Endometriumkarzinom in G1 bis G3 differenziert und klarzellige Karzinome sind immer als G3 eingeteilt. Bei allen anderen in der WHO-Klassifikation von 2014 genannten erfolgt keine Graduierung. Die Differenzierung in die histologische Einteilung kann fakultativ immunhistochemisch gesichert werden, was die Sicherheit der Einteilung erhöht (Kobel et al. 2016). Insgesamt gibt die Leitlinie umfangreiche, neue konsensbasierte Empfehlungen für die makroskopische Beurteilung und histologische Aufarbeitung des Ovarialkarzinoms heraus (Leitlinienprogramm Onkologie 2019).

#### **1.1.5. Therapie und Verlauf**

Bisher konnten keine prädiktiven Marker unter anderem auf genetischer Basis oder anhand von Tumormarkern als effektiv nachgewiesen werden, welche mit dem Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie korrelieren. Die entsprechende Erforschung prädiktiver Marker unterliegt umfangreichen wissenschaftlichen Anstrengungen. Nach wie vor entscheidend für das Überleben der betroffenen Patientinnen bleiben neben Alter und Allgemeinzustand die Qualität des operativen Stagings sowie der postoperative Tumorrest.

Da eine neoadjuvante Therapie bisher keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Schwartz et al. 1999) und wenn überhaupt einen geringen Einfluss auf die perioperative Mortalität in einem weit fortgeschrittenen Stadium FIGO IV (Glasgow et al. 2013) zeigen konnte, verbleibt als wichtigster Prognosefaktor mangels apparativer Möglichkeiten ein umfangreiches intraoperatives Staging durch den erfahrenen Gynäkoonkologen im Rahmen einer Laparotomie (Trimbos et al. 2010). Die anschließende und von einem kompletten Staging abhängige Zytoreduktion hat immer eine makroskopisch vollständige Entfernung malignitätsverdächtiger intraperitonealer Befunde zum Zweck und beeinflusst neben dem histologischen Subtyp am maßgeblichsten von allen genannten Parametern über alle Tumorstadien die Prognose der betroffenen Patientin (Du Bois et al. 2009). Grundsätzlich fallen hierunter eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie, Omentektomie, sowie die Entfernung betroffener Nachbarstrukturen soweit dies möglich ist und hierdurch makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden kann. Dies erfolgt dann zum Beispiel

im Sinne einer umfangreichen Debulkingoperation durch Entfernung von Anteilen des Gastrointestinaltrakts, Lymphknoten etc.

Nur in seltenen Ausnahmefällen eines unilateralen Frühstadiums und bei Kinderwunsch kann fertilitätserhaltend operiert werden, allerdings nur nach umfangreicher Beratung zu den bestehenden Risiken (Ayhan et al. 2003).

Auf die obligate zytoreduktive Operation folgt in der Mehrzahl der Fälle eine adjuvante Chemotherapie. Ausgenommen sind nach aktuell gültiger Leitlinie hiervon nur Patientinnen mit einem frühen Tumorstadium 1a, Grad 1 (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Allerdings ergeben sich in neueren Studien erneut Hinweise, dass auch im frühen Stadium I und II eine Chemotherapie das Gesamtüberleben verbessert, auch wenn die Patientinnen nicht so umfangreich profitieren wie in den fortgeschrittenen Stadien (Lawrie et al. 2015).

Insgesamt sind hier individuelle Entscheidungen möglich. Alle anderen Patientinnen erhalten eine platinhaltige Chemotherapie in Kombination mit Taxanen und in fortgeschrittenem Stadium eine mögliche Hinzunahme des VEGF-Inhibitors Bevacizumab. Die Kombination einer Therapie mit Carboplatin AUC5 und Paclitaxel alle 3 Wochen für 6 Zyklen wird durch die S3-Leitlinie mit einem Evidenzgrad 1++ vorgegeben. Eine Metaanalyse zeigte hier die Vorteile einer Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie (Aabo et al. 1998) sowie neuere Studien die Vorteile des bereits bei anderen fortgeschrittenen Tumorentitäten erfolgreich eingesetzten Antikörpers Bevacizumab im fortgeschrittenen Stadium des Ovarialkarzinoms (Burger et al. 2011). Bevacizumab ist eine Angiogeneseinhibitor, welcher zielgerichtet an den Wachstumsfaktor VEGF bindet und somit vor allem die Neuanlage von Blutgefäßen, welche essentiell für das Tumorwachstum sind, unterbindet (Prager et al. 2010).

Insgesamt wird in der Literatur von initialen Ansprechraten von 65-80 % auf die Firstline-Chemotherapie gesprochen. Der Tumormarker CA-125 kann für ein Therapiemonitoring verwendet werden (Zwakman et al. 2016).

Trotz der vielversprechenden initialen Ansprechraten entwickelt ein Teil der Patientinnen Rezidive, welche sich in Frührezidive mit Auftreten während der Therapie oder innerhalb von 6 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie einteilen lassen, die sogenannten platinresistenten Verläufe. Außerdem in die späteren platinsensitiven Verläufe, welche ein Rezidiv später als 6 Monate nach Abschluss der Chemotherapie entwickeln.

Da ein Ziel dieser Arbeit war, prognostische Tumormarker für das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie zu identifizieren, wurden aus den primär vom Ovar ausgehenden Tumorentitäten Patientinnen ausgewählt, welche bereits retrospektiv erfasst ein unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie hatten. Die damalige Einteilung erfolgte ebenfalls nach dem zeitlichen Auftreten eines Rezidivs in Zusammenhang mit dem Abschluss der Chemotherapie: Als resistent wurden Tumoren betrachtet, welche ein Rezidiv oder einen Progress noch während der ersten Chemotherapie zeigten, als refraktär solche, welche ein Rezidiv innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Therapie zeigten, intermediär diejenigen, welche zwischen sechs und zwölf Monaten ein Rezidiv entwickelten und als sensibel solche, die später als zwölf Monate nach Abschluss der Chemotherapie ein Rezidiv zeigten.

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir unterschieden in eine Patientengruppe mit einem resistenten/refraktärem Verlauf und in eine mit einem nicht refraktären bzw. intermediären oder sensiblen Verlauf. Somit ist die Einteilung der beiden Patientengruppen in dieser Arbeit analog zur aktuellen Leitlinie, allerdings sind die Bezeichnungen different.

In jedem Fall ist ein Rezidiv mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Im Sinne eines palliativen Behandlungskonzeptes können beispielsweise Patientinnen mit einem platinresistenten Rezidiv verschiedene Monotherapien mit Gemcitabine, pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Paclitaxel oder Topotecan erhalten. Patientinnen mit platinsensitivem Rezidiv können eine Kombinationstherapie der genannten Substanzen mit Carboplatin und in einigen Fällen zusätzlich mit Bevacizumab erhalten (Leitlinienprogramm Onkologie 2019).

Insbesondere beim platinresistenten Rezidiv sollte jedoch der Fokus des Therapiekonzeptes im Sinne einer Best Supportive Care liegen, da das mediane Überleben von lediglich 6 Monaten eine infauste Prognose zugrunde legt (Markman et al. 2004).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass trotz umfangreicher wissenschaftlicher Ansätze, das Ovarialkarzinom eine der tödlichsten malignen Erkrankungen der Frau darstellt und insbesondere durch späte Diagnostik im fortgeschrittenen Stadium und schlechtes Therapieansprechen eine sehr hohe Mortalität aufweist.

### 1.1.6. Neue Entwicklungen im Bereich der gezielten Krebstherapie

Über die bereits in der vorherigen Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2017) in der Behandlung des Ovarialkarzinoms implementierten gezielten Krebstherapien hinaus, konnten aus neueren genetischen Studien mehrere Signalwege untersucht werden, deren Nutzung zukünftig das Überleben verbessern könnten bei gleichzeitig reduzierten Nebenwirkungen. Vor allem sogenannte PARP-Inhibitoren, Wirkstoffe welche das Einzelstrang-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase hemmen, zeigten sich als effektiv in der Therapie des Ovarialkarzinoms, wenn sie zusätzlich zur Standardtherapie eingesetzt werden, beispielsweise Niraparib (Mirza et al. 2016). Hieraus ergab sich eine Modifizierung der Leitlinie hin zu einem Empfehlungsgrad B für Patientinnen mit dem Rezidiv eines high-grade Ovarialkarzinoms, welchen nach Ansprechen auf eine platinhaltige Rezidivtherapie eine Erhaltungstherapie mit einem PARP-Inhibitor angeboten werden sollte (Leitlinienprogramm Onkologie 2019).

Die Hemmung des Einzelstrang-Reparaturenzyms führt konsequenter Weise zu Doppelstrangbrüchen sobald die DNA-Replikation an der Replikationsgabel im Verlauf der Zellteilung angekommen ist. Die *BRCA1/2*-Mutation, welcher einer aktuellen Arbeit der AGO Studiengruppe zufolge bei 20,8 % (Leitlinienprogramm Onkologie 2019) der untersuchten Fälle von Ovarialkarzinomen vorliegt, führt entscheidender Weise dazu, dass das entsprechende Tumorsuppressorgen, welches DNA-Reparaturen durchführt, seine Funktion verliert. Nach Doppelstrangbrüchen ist ein funktionierendes *BRCA1/2*-Genprodukt dazu in der Lage diese Brüche homolog zu reparieren. Ein entsprechender Tumor, welcher nach einem Verlust dieses Gens entstanden ist, kann unter Einsatz eines PARP-Inhibitors die eigene geschädigte DNA nicht reparieren und es folgt die Apoptose der Tumorzelle. Somit ergibt sich, dass PARP-Inhibitoren, aktuell vor allem nachgewiesen für Olaparib, bei Trägerinnen einer *BRCA1/2*-Mutation am effektivsten sind.

Eine randomisierte plazebokontrollierte Doppelblindstudie konnte sogar ein verlängertes progressionsfreies Gesamtüberleben für eine Langzeitmonotherapie mit Olaparib nach Abschluss der Chemotherapie für Mutationsträgerinnen nachweisen (Ledermann et al. 2016). Aktuell befinden sich mehrere Wirkstoffe aus der Gruppe der PARP-Inhibitoren in Phase-III-Studien.

Nachdem bereits Bevacizumab als Angiogeneseinhibitor Einzug in die Standardtherapie vieler fortgeschrittener Tumorentitäten gefunden hat, erscheint es

folgerichtig im Bereich der VEGF-induzierten Gefäßversorgung weitere Signalwege zu untersuchen. Tyrosinkinaseinhibitoren, welche gezielt die Aktivierung von VEGF hemmen, und somit noch früher in der Signalkaskade ansetzen, wurden ebenfalls bisher hauptsächlich in Phase-II-Studien untersucht. Die Wirkstoffe Pazopanib, Nintedanib und Cidiranib zeigten in mehreren aktuellen Studien zwar zum Teil ein verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Standardtherapie, allerdings erwiesen sich die Nebenwirkungen als problematisch, wie eine zusammenfassende Publikation zeigt (Guan und Lu 2018).

Bereits seit einigen Jahren ist der Metabolismus von Folsäure über Folatrezeptoren im Fokus vieler Arbeitsgruppen, da diese auf vielen Tumorzellen überexprimiert werden und weniger häufig auf anderen Geweben (Parker et al. 2005). Beim Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Folatrezeptoren mit einer verschlechterten Prognose vergesellschaftet ist (Chen et al. 2012). Mehrere Autoren fassten daher in einer aktuellen Publikation sowohl neuere Erkenntnisse der Grundlagenforschung als auch translationale Ansätze von der „7th International Symposium on Folate Receptors and Transporters“, einer wissenschaftlichen Tagung aus Oktober 2018, systematisch zusammen (Frigerio et al. 2019).

Sicher ist, dass Folsäure selbst, die Folsäureaufnahme über Folatrezeptoren und die Verstoffwechselung eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel und im Zellwachstum einnimmt, hier vor allem bei DNA-Replikation, -Reparatur und -Methylierung. Ebenfalls ist bekannt, dass Folatrezeptoren für die Anbindung von Komplementfaktoren, immunologischen Effektorzellen wie Makrophagen und T-Helferzellen entscheidend sind und somit die Induktion von Apoptose hierüber induziert werden kann. Dieser Bereich ist Bestandteil intensiver Forschungsansätze, in denen sich bereits mehrere Folatrezeptorantikörper in Phase-III-Studien für eine Behandlung des Ovarialkarzinoms befinden.

Vintafolid, ein Konjugat aus Folat und einem mitosehemmenden Wirkstoff, wird durch Endozytose über den Folatrezeptor in die entsprechende Tumorzelle aufgenommen und hemmt dann die weitere Zellteilung (Leamon et al. 2007). In einer Phase-II-Studie konnte ein Ansprechen für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom festgestellt werden (Morris et al. 2014). Die Möglichkeit der Endozytose über den Folatrezeptor (Leamon und Low 1991) ist ein Bereich intensiver Forschung zum gezielten Einbringen von verschiedenen an Folat gebundener Wirkstoffe geworden:



Neueste Forschungen, welche allerdings bisher weder umfangreich klinisch noch speziell beim Ovarialkarzinom untersucht worden sind, analysieren zum Beispiel das Einbringen von Folatkonjugaten mit magnetischen Nanopartikeln, welche eine Hyperthermie im aufnehmenden Gewebe induzieren können (Di Corato et al. 2011). Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass DNA-Nanostrukturen an Folatrezeptoren binden können und sehr gezielt Chemotherapeutika wie Doxorubicin in Folatrezeptor-exprimierende Zellen einbringen können (Raniolo et al. 2018).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass insbesondere die gezielte Krebstherapie mit ihrer selektiven Therapie von Karzinomzellen, auch im Bereich des Ovarialkarzinoms aktuell von stärkster Relevanz ist und zukünftig hoffentlich das therapeutische Ansprechen bei Reduktion der Nebenwirkungen verbessert. Unterstützt werden die therapeutischen Bemühungen insbesondere vom Aufbau entsprechender Gendatenbanken, um zum Beispiel über Methoden des Next Generation Sequencing als Hochdurchsatz-DNA-Analyse mögliche genetische Zielstrukturen in großem Maßstab ökonomisch effizient zu identifizieren.

#### **1.2.24-Farben Karyotypisierung/SKY**

Die 24-Farben Karyotypisierung oder Spektrale Karyotypisierung (SKY) ist eine molekularzytogenetische Methode zum Anfärben des ganzen Chromosoms (whole chromosome painting) und wurde 1996 durch Schröck et al. publiziert. Sie ist eine Form der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und benötigt daher Zellkulturen, deren Zellen für eine Chromosomenpräparation in der Metaphase arretiert wurden. Die chromosomenspezifische Färbung wird durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der zu untersuchenden Metaphasen mit einer mit Fluorophoren in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewonnenen Vergleichs-DNA erzeugt. Die in der PCR verwendeten Nukleotide sind mit 5 verschiedenen Fluorophoren (Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5 und Texas Red) verbunden, welche auf der hybridisierten Metaphase ein chromosomenspezifisches Spektrum emittieren.

Die chromosomenspezifische Färbung wird durch die Kombination der verschiedenen Fluorophore erzeugt. Um den chromosomenspezifischen Spektrumsunterschied zu erhöhen, werden repetitive nicht kodierende DNA-Abschnitte durch Hinzufügen von entsprechender Cot-1 DNA blockiert und in der anschließenden Analyse nicht erfasst. Es handelt sich hierbei um eine kompetitive

Hemmung. Hiervon sind insbesondere zentromernae Abschnitte betroffen (Schröck et al. 1996), was zu Einschränkungen in der Auswertbarkeit der entsprechenden Abschnitte führt.

Nach der Hybridisierung erfolgt die Erfassung der entsprechenden Spektren durch ein speziell aufgerüstetes Fluoreszenzmikroskop (in dieser Arbeit das Mikroskop Axiovert 135, Zeiss), indem die emittierten Lichtwellen durch einen Triple Bandpass Filter und ein Interferometer selektiert und anschließend durch eine gekühlte konventionelle CCD-Kamera Pixel für Pixel aufgenommen werden (s. Abbildung 1). Unmittelbar erzeugt wird ein direktes Bild der fluoreszierenden Chromosomen, wobei durch den Betrachter am Mikroskop, bedingt durch die zu geringe Wellenlängendifferenzierung und –bandbreite des menschlichen Auges, nicht alle Chromosomen farblich unterschieden werden können. Außerdem wird ein inverses DAPI-Bild erzeugt, welches vergleichbar mit der Betrachtung einer konventionell gefärbten Metaphase im Phasenkontrastmikroskop ist (s. Abbildung 2). Die hier erwähnte konventionelle Bänderungstechnik setzt eine Behandlung der Chromosomen mittels Trypsin voraus und erfolgt durch die von Gustav Giemsa 1904 veröffentlichte Azur-Eosin-Methylenblau-Färbung (Barcia 2007).

Durch den Computer wird aus der Aufnahme der CCD-Kamera ein RGB-Bild errechnet, welches sich wie folgt zusammensetzt: Cy2 = blau, Cy3 und Texas Red=grün, Cy5 und Cy5.5=rot. Aus den erfassten 5 Fluorophoren wird nachfolgend ein Falschfarbenbild generiert, welches dann eine Differenzierung in 24 verschiedene Farbkombinationen entsprechend den erfassten Chromosomen ermöglicht. Die anschließende Auswertung erfolgt wie weiter unten beschrieben.



Abbildung 1: Mittig im Bild ist das Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) zu sehen, welches auf der linken Seite mit der gekühlten CCD Kamera verbunden ist. Die erzeugten Aufnahmen werden unmittelbar auf den angeschlossenen PC übertragen. Außerdem ist an selbigem Mikroskop auf der rechten Seite eine Vorrichtung zur Chromosomenmikrodissektion mittels Mikromanipulator zu sehen. Ergebnisse dieses Verfahrens wurden durch die Arbeitsgruppe des Onkologischen Labors mehrfach erfolgreich publiziert (Micci et al. 2010; Weimer et al. 2001).

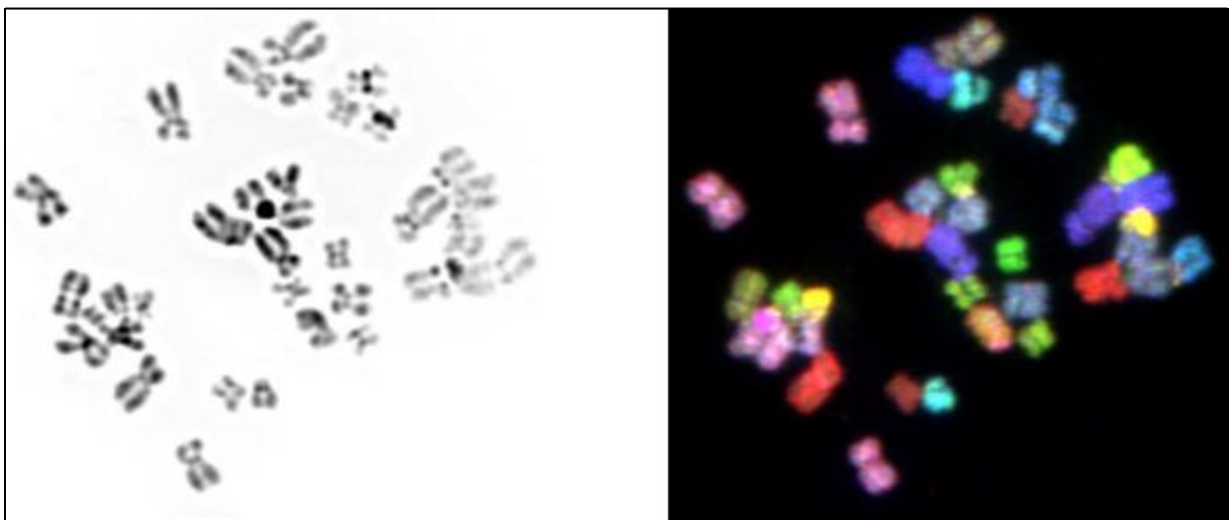


Abbildung 2: Auf der linken Seite ist das inverse DAPI-Bild zu sehen, welches bereits erste Hinweise auf numerische und strukturelle Aberrationen gibt. Auf der rechten Seite das direkte Bild der fluoreszierenden, individuell gefärbten Chromosomen.

### **1.3. Zielsetzung der vorgelegten Arbeit**

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, mit Hilfe der 24-Farben Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung anhand der Metaphasen von ausgewählten Zellkulturen des Ovarialkarzinoms wiederkehrende chromosomale Aberrationen zu finden, welche mit dem Ansprechen auf eine platinhaltige Firstline-Chemotherapie korrelieren. Hierzu wählten wir primäre Zellkulturen von Chemotherapie-naiven Tumoren von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom aus und untersuchten diese mit der SKY-Technik mittels whole-chromosome-painting. Anschließend erfolgte die Zuordnung der Ergebnisse zum klinischen Platinansprechen der Patientinnen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob durch die SKY-Analyse überhaupt wiederkehrende Markerchromosomen in der untersuchten Patientengruppe gefunden werden können und ob diese signifikant mit dem Platinansprechen in Zusammenhang gesetzt werden können. Ferner ergaben sich Fragen nach der Effektivität und Reliabilität des angewandten Verfahrens. Die Arbeitsgruppe des Onkologischen Labors nutzte die erhobenen Daten außerdem für einen Methodenvergleich mit der array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (arrayCGH) als Basis für weiterführende Studien an einer größeren Kohorte (Rohwer et al. 2018). Insgesamt konzentrieren sich die Arbeiten auf die Suche nach prädiktiven Markern im Rahmen einer translationalen genetischen Forschung.

Die konkrete Fragestellung in der vorliegenden Arbeit ist somit, ob mittels SKY-Analyse überhaupt häufig wiederkehrende chromosomale Aberrationen gefunden werden können, welche ferner in Korrelation zu einer platinbasierten Chemotherapie stehen könnten. Für die Korrelation der chromosomalen Veränderungen wurde als Alternativhypothese angenommen, dass einzelne Veränderungen sich als potentielle Markerchromosomen eignen würden, d.h. derart gehäuft über alle Metastasen einer der beiden Patientengruppen auftraten, dass eine signifikante Zuordnung möglich wäre. Die Nullhypothese indes wäre, dass das Auftreten der verschiedenen Aberrationen rein zufällig und völlig unabhängig vom Therapieansprechen der Patientinnen wäre.

Ferner sollte ermittelt werden, ob die SKY-Analyse hierfür aus ökonomischen Aspekten und Anhand des zeitlichen Aufwands ein geeignetes Verfahren ist.

## 2. Material

---

### 2.1. Arbeitsgeräte

3130 Genetic analyzer, Applied Biosystems

Heizplatte, 40°C, Medax

Invers-Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) mit komplettem System für SKY Vision II von Applied Spectral Imaging Ltd.

- I. Fluoreszenzfähige CCD-Kamera (Hamamatsu, C4880-81/82)
- II. Beleuchtungseinrichtung für Auflichtfluoreszenz (Zeiss)
- III. ASI Triplebandpass-Filter
- IV. ASI Anregungsfilter DAPI
- V. HBO-100/2-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe zur Fluoreszenzanregung, Osram
- VI. Phasenkontrasteinrichtung für 100x- und 10x-Objektiv (Zeiss)

Neubauer Zählkammer (Größe 0,0025 mm<sup>2</sup> und 0,0625 mm<sup>2</sup>, Tiefe 0,1 mm)

Pipettensätze, 2 Stück, Eppendorf

Schüttelinkubator für Eppendorf-Tubes

Thermocycler (MJResearch PTC-150 und PTC-200)

UV/VIS-Spektrometer, Pharmacia Biotech, Image Master VDS

Vakuumzentrifuge, Scan Speed 32, Scanvac

Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.

Wasserbäder, Clifton Duo Bath

Wärmeschrank, Memmert

Zentrifuge Universal 16R, Hettich

### 2.2. Materialien

Behälter aus rostfreiem Edelstahl mit Deckel (20x30 cm)

Deckglas (60x24, 24x24 und 22x22 mm), Menzel-Gläser

Einmal-Handschuhe, Peha-Soft, Hartmann

Eppendorf-Tubes

Gestopfte, sterile Pipettenspitzen (1000, 200, 100, 20, 5 µl), Biozym

Glasflaschen 500 und 1000 ml, Duran

Nicht-fusselndes Tuch, Kimtech Science, Kimberly-Clark

Objektträger, 76x26 mm, Menzel-Gläser

Sterile Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml), Corning

### **2.3. Gebrauchsfertige Lösungen und Chemikalien**

Absolutes Ethanol, Merck, Verdünnungsreihen mit Aqua dest.

AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit (enthaltene Lösungen, siehe 3.3.)

Ampuwa-Wasser, Fresenius

Antifade (0,5 µg/ml DAPI), Vectashield

Bacto-Trypsin (6x10 ml), Difco

Colcemidlösung, BRL Karyomax colcemid solution, Gibco

DAPI, Boehringer

EDTA-Lösung (0,02 %), Invitrogen

Eisessig, Merck

GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard, Applied Biosystems

Gentra Puregene Cell Kit, Qiagen (enthaltene Lösungen, siehe 3.2.)

Giemsa-Lösung, Merck

HCl-Lösung, Merck

Isopropanol (1.09634.2500), Merck

Formamid (molecular biology grade, Sigma Cat#7503)

MgCl<sub>2</sub>-Lösung 1 M (Sigma Cat#F7503)

NaCitrat, Merck

PBS (1x ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Gibco, isotonische Salzlösung mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Gesamt-Phosphat (HO<sub>4</sub>P<sub>-2</sub> und H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(-)), pH-Wert 7,4

Pepsin Stock (Sigma Cat#P6887)

Rubber Cement, Tamm, Fixogum, Marabu

Tris/HCl (500 g), Sigma

Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/002 % in PBS), Sigma

Trypsinlösung (0,025 %), Invitrogen

Tween 20, (SigmaCat#P9416)

## **2.4. Herzustellende Lösungen**

Fixativ: 3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessig (-20 °C)

Hypotone Lösung: 0,4 g KCl auf 100 ml Aqua dest. (37 °C)

MilliQ Wasser, Aqua destillata von Milli-Q® Direct Water

modifizierte Ibraimov-Lösung: 5 ml Eisessig, 3 ml Methanol in 92 ml Aqua dest.

SSC (20x): 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0

Denaturierungslösung: 70 % Formamid, 2xSSC, pH 7,0

RPML-1640 Medium (Biochrom, Berlin) mit 10 % fetalem Kälberserum (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) versetzt mit 10.000 U/ml Penicillin (Biochrom) und 10.000 µg/ml Streptomycin (Biochrom)

## 2.5. Vorbereitung SKY-Hybridisierungsprotokoll

### 2.5.1. Tag 1

Für Tag 1 des SKY-Hybridisierungsprotokolls wurden folgende Lösungen in der Vorbereitung hergestellt:

- 0,01 M HCl: 0,5 ml 1 M HCl-Lösung mit 49,5 ml Aqua dest. vermischen
- Pepsin Stock: Vorbereitung von einer 10 %igen Lösung (100 mg/ml) in sterilem Wasser. Gut vortexen und zu 10 µl aliquotieren. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.
- 1x PBS: Für die entsprechend vielen Waschschrte wurde 1 l Lösung aus 50 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 950 ml 1x PBS angesetzt.
- Ethanolreihe: 70 %, 80 %, 100 % Ethanol/Aqua dest.-Lösung herstellen und in die Färbertröge füllen. Weitere drei entsprechende Färbetröge vorbereiten und auf -20 °C herunter kühlen.
- Denaturierungslösung: 35 ml Formamid 10 ml Aqua dest. und 5 ml 20xSSC vermischen und mit HCl auf pH 7,0 titrieren. Erwärmung auf 72 °C im Wärmebad.

### 2.5.2. Tag 2

Für Tag 2 des SKY-Hybridisierungsprotokolls wurden folgende Lösungen in der Vorbereitung hergestellt:

- Waschlösung I: 15 ml 20xSSC, 60 ml Aqua dest., 75 ml Formamid, pH mit HCl auf 7,0 einstellen und im Wasserbad auf 45 °C erhitzen.
- Waschlösung II: 12,5 ml 20xSSC, 237,5 ml Aqua dest., gut mischen und im Wasserbad auf 45 °C erhitzen.
- Alternative Waschlösung: „rapid washing“ - 2 ml 20xSSC, 98 ml Aqua dest., gut mischen und im Wasserbad auf 72 °C erhitzen.
- Waschlösung III: 100 ml 20xSSC, 400 ml Aqua dest., 0,5 ml Tween 20, gut mischen und im Wasserbad auf 45 °C erhitzen.



## **2.6. Cad kit**

Die nachfolgend aufgeführten Reagenzien wurden durch den Hersteller fertig als Applied Spectral Imaging's CAD kit for Human chromosomes Lot#11223 geliefert:

Vial 1: Spectral Karyotyping (Human) Reagent

Vial 2: Blocking Reagent

Vial 3: Cy5 Staining Reagent

Vial 4: Cy5.5 Staining Reagent

Vial 5: Anti-fade-DAPI Reagent.

Das CAD kit beinhaltet somit die an Antikörper bzw. Biotin konjugierten Fluorophore für die Hybridisierung.

## **2.7. Zellkulturen**

Als Grundlage dieser Arbeit wurden Zellkulturen durch das Onkologische Labor der Frauenklinik zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um kryokonservierte Kurzzeitkulturen und entsprechende Chromosomenpräparationen aus OP-Präparaten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Kiel. Die histologische Aufarbeitung wurde freundlicherweise durch das Institut für Pathologie am UKSH Campus Kiel durchgeführt.

Prof. Dr. Felix Hilpert erfasste retrospektiv zu den entsprechenden Patientinnen unter anderem folgende Daten: Geburtsdatum, Körpergröße und -gewicht, Alter bei Erstdiagnose, FIGO-Stadium, histologische Einteilung, Grading, CA-125 Konzentration prä-OP, OP-Modus, Chemotherapie und Ansprechen, sowie hierbei vor allem rezidivfreies Überleben und Platin-Sensibilität. Die Auswahl der Patientinnen erfolgte aus einer klinikinternen Datenbank und es wurden zunächst nur Chromosomenpräparate aus Zellkulturen der OP-Präparate von 34 Patientinnen ausgewählt, deren primäres Therapieansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie als refraktär oder sensibel eingestuft worden war (siehe 3.1 Tabelle 1). Die OP-Präparate wurden zwischen 1999 und 2011 gewonnen.

Alle Patientinnen stimmten einer Teilnahme an entsprechenden Studien und der Verwendung von Tumormaterial zu wissenschaftlichen Zwecken zu. Nach Auswahl der fixierten Chromosomenpräparationen wurden der Patientennamen und das Geburtsdatum numerisch verschlüsselt. Alle erhobenen Daten wurden den Datenschutzbestimmungen entsprechend vertraulich behandelt.

Nach aktuellen Therapieempfehlungen wird das Outcome bei an Ovarialkarzinomen erkrankten Patientinnen durch ein ausgedehntes primär chirurgisches Vorgehen entscheidend beeinflusst (Du Bois et al. 2009). Eine neoadjuvante Therapie verbessert die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nicht (Schwartz et al. 1999). Die Gewinnung des Tumormaterials erfolgte daher bei allen Patientinnen aus dem primären OP-Resektat.

Die Herstellung der primären Zellkulturen erfolgte durch Mitarbeiter des Onkologischen Labors direkt aus dem OP-Resektat. Das Resektat wurde in 1 mm<sup>3</sup> Stücke geschnitten, welche dann in einer Lösung aus RPMI-1640 Medium kultiviert wurden. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Nach einer Wachstumszeit auf einen 80 % konfluierender Zellverband erfolgte die Zelldissoziation mit Trypsin-EDTA. Die entsprechenden Kulturen wurden für weitere Forschungsarbeiten in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen standen bereits zu Beginn der Arbeit nach oben genanntem Procedere hergestellte kryokonservierte Zellkulturen zur Verfügung. Für einen Teil der Patientinnen bestanden bereits Chromosomenpräparationen, für die verbleibenden wurden diese, wie unter 2.8. dargestellt, durch Mitarbeiter des Onkologischen Labors hergestellt.

## **2.8. Chromosomenpräparation**

Die kryokonservierten Zellen wurden für die Chromosomenpräparation wieder in Kultur genommen und nach einer Wachstumsphase bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % wurde 1 Tropfen der benötigten Colcemidlösung zur Arretierung der Zellen in der Metaphase in das Kulturmedium gegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen, indem zunächst das Zellmedium verworfen wurde und das verbleibende Pellet mit 5 ml EDTA-Lösung (0,02 %) ca. 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgegossen wurde.

Dann folgte die enzymatische Ablösung mit 5 ml Trypsinlösung (0,025 %) für 15 min bei 37 °C. Mit einer Pipette wurden die Zellen anschließend resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 300 g. Alle nachfolgenden Zentrifugationen der Zellen erfolgten ebenfalls mit 300 g standardisiert. Alternativ zu der vorgenannten Ablösung in zwei Schritten wurde im SOP-Protokoll auch eine Ablösung mit Trypsin/EDTA für 15 min bei 37 °C vorgegeben.

Anschließend erfolgte die eigentliche Chromosomenpräparation: Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis ca. 1 cm über dem Pellet abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit einer Pipette resuspendiert. Es wurden 10 ml hypotone Lösung zugegeben und das Ganze mit der Pipette vorsichtig gemischt. Die entstandene Lösung wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und dann mit 4-7 Tropfen Eisessig gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. Der Überstand wurde anschließend erneut bis auf 1 cm abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde wieder gründlich resuspendiert und unter Zugabe von 10 ml modifizierter Ibraimov-Lösung gründlich gemischt, siehe 2.4. (Ibraimov, 1983). Sofort danach erfolgte die Zentrifugation für 10 min. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml verworfen und das Pellet gründlich resuspendiert. Unter Zugabe von 10 ml frischem, eiskaltem Fixativ wurden die Zellen erneut gut gemischt. Sofort danach erfolgte wieder eine Zentrifugation für 10 min und der entstandene Überstand wurde möglichst vollständig verworfen. Es wurde 10 ml frisches, eiskaltes Fixativ zugegeben und sofort danach erneut zentrifugiert für 10 min. Der Überstand wurde wieder möglichst vollständig verworfen und die Zellen über Nacht bei -20 °C gelagert. Danach wurde das Pellet gründlich resuspendiert und je nach Zelldichte mit frischem Fixativ zum Auftropfen verdünnt.

Wie weiter unten beschrieben, musste die Zellkonzentration bei vielen Chromosomenpräparaten nachträglich entsprechend korrigiert werden. In jedem Falle wurde die entstandene Zellsuspension einmalig auf saubere, eiskalte, feuchte Objektträger aufgetropft und die Objektträger dabei auf feuchte Tücher auf eine Heizplatte (40 °C) gelegt, wo sie dann 30-60 min altern sollten. Danach wurde die Metaphasequalität, wie weiter unten beschrieben, mikroskopisch bewertet.

### 3. Methoden

---

#### 3.1. Auswahl der Chromosomenpräparationen

Die in einem Methanol/Eisessiggemisch 3:1 Langzeit-konservierten Zellen mit Chromosomenpräparation wurden aufgetaut und einmalig konventionell auf einen Objektträger getropft. Dieser war zuvor durch eine mindestens 7-tägige Vorbehandlung mit 1 % HCl/Ethanol-Lösung gereinigt und mit einem nicht-fusselnden Tuch getrocknet worden. Die vorhandenen Metaphasen wurden dann vor allem hinsichtlich ihrer Quantität im Phasenkontrast des Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss) bewertet.

Hierbei fielen drei verschiedene mögliche Einschränkungen für die spätere Verwendung in einer SKY-Hybridisierung auf: Bei einem Teil der Chromosomenpräparate konnte kein Zellzyklusarrest in der Metaphase ausgelöst werden, sodass bei sehr hoher Zelldichte insgesamt zu wenige Metaphasen für eine SKY-Auswertung auf dem Objektträger vorhanden waren. Die entsprechenden Präparate wurden zunächst nicht weiter verwendet.

Als weiteres Problem trat bei einigen Präparaten eine zu hohe oder zu niedrige Zelldichte bei ausreichend vorhandenen Metaphasen auf, was sich in einigen Fällen durch erneute Aufbereitung beheben lies: nach Zentrifugation mit 300 g, wurde der Überschuss an Methanol/Eisessig verworfen und durch Zugabe von entsprechend mehr oder weniger neuer Konservierungslösung die Zellkonzentration verändert. Sollte zum Beispiel nach visuell subjektiver Betrachtung im Mikroskop die Zelldichte nur geringfügig reduziert werden, so erfolgte die Änderung der Konzentration um die Hälfte durch zufügen von der zweifachen Menge Fixativ im Vergleich zur Ausgangsmenge. Bei stark erhöhter Zelldichte und vollständiger Überlagerung der Metaphasen erfolgte die Verdünnung maximal um den Faktor 10. Analog hierzu mussten auch einige Proben stärker konzentriert werden, um ausreichend Metaphasen in einem Mikroskopbild zur Darstellung zu bringen. Auch hierin zeigte sich die hohe Heterogenität der Zellen nicht nur im Hinblick auf die spätere genetische Analyse, sondern auch ihr Zellwachstum in der Kultur und die Möglichkeit sie in der Metaphase zu arretieren.

Außerdem wiesen einige Proben starke Verunreinigung durch Zellbestandteile auf, welche nur in wenigen Fällen durch mehrfaches Waschen mit Methanol/Eisessig reduziert werden konnten.

Es ergab sich, dass aus den ausgewählten Proben in der Vorselektion nur wenige ausreichend geeignet waren, um sie für die weitere Versuchsreihe verwenden zu können. Daher wurden Chromosomenpräparate von 25 weiteren Patientinnen mit intermediärem oder resistentem Ansprechen auf eine Platin-haltige Chemotherapie hinzugefügt und es erfolgte ebenfalls eine Überprüfung der Metaphase-Qualität. Zeitgleich erfolgte die Neuanzucht von Zellkulturen analog zu 2.7. und 2.8. der bei fehlendem Metaphase-Arrest ausgeschiedenen Proben durch Mitarbeiter des Onkologischen Labors. Eine Auswahl der Neuanzüchtungen wurde erfolgreich in der Metaphase arretiert und dem Patientenkollektiv wieder zugeführt.

Zur weiteren Überprüfung der Eignung für die SKY-Analyse wurden im nächsten Schritt nochmals alle ausgewählten Objektträger hinsichtlich ihrer Metaphase-Qualität im Phasenkontrastmikroskop gesichtet: entscheidend für die spätere Auswertung war insbesondere die Spreitung, d.h. die flächige Ausbreitung der Chromosomen, sowie die Stärke der Kondensation der DNA. Die Größe der Chromosomen ist abhängig vom Kondensationsgrad und beeinflusst erheblich die Auswertbarkeit hinsichtlich möglicher struktureller Aberrationen wie Translokationen in der SKY-Analyse. Auf einigen Objektträgern trat gehäuft ein Problem der zu geringen Spreitung der vorhandenen Metaphasen auf.

Die Spreitung konnte durch unterschiedliche Tropftechniken verbessert werden, da sie zu einem Großteil von der Verdunstungsgeschwindigkeit der Fixierlösung abhängig ist. Daher konnten Verbesserungen durch Änderungen der einflussnehmenden Parameter Luftfeuchtigkeit und Temperatur in der feuchten Kammer (hier Metallkästchen 20x15x5 cm mit Deckel auf einer Heizplatte), Tropfhöhe (bis ca. 20 cm Abstand Pipettenspitze-Objektträger) und Tropfmenge (10-50 µl) erzielt werden. Gute Spreitungsergebnisse wurden mit geringer Tropfmenge (10 µl), hoher Fallhöhe (20 cm) sowie 38 °C Temperatur und 100 % Luftfeuchtigkeit (feuchtes Tuch mit Bildung von Kondensationsflüssigkeit am Deckel des Metallkästchens) und auf -20 °C vorgekühlten Objektträger erzielt. Direkt nach dem Tropfen des Objektträgers wurde die feuchte Kammer verschlossen und nach 60 s die Objektträger wieder herausgenommen. Anschließend erfolgte die Trocknung bei Raumluft.

Insgesamt wurden Chromosomenpräparationen von 9 Patientinnen für die weitere Verwendung ausgewählt, wie in Tabelle 1 mit klinischen Daten dargestellt.

Patientin Nummer	Alter bei ED	FIGO Stadium	Platinsensibilität alt	Platinsensibilität neu	Histologie
1	64	IIIc	intermediär	sensitiv	serös
2	61	IIIb	sensibel	sensitiv	serös papillär
3	67	IIIc	resistent	resistent	serös
4	26	IIIc	intermediär	sensitiv	serös papillär
5	58	IIIc	resistent	resistent	serös papillär
6	43	IV	refraktär	resistent	serös papillär
7	55	IIIc	refraktär	resistent	serös papillär
8	48	IV	sensibel	sensitiv	serös
9	47	IV	refraktär	resistent	muzinös

*Tabelle 1: Die Patientinnen sind entsprechend ihrer numerischen Zuordnung im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Alter bei Erstdiagnose, FIGO Stadium und der damaligen histologischen Einteilung aufgeführt. Zum besseren Verständnis wurden die alte und die neue Einteilung für das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie dargestellt, siehe 1.1.4. Pathologische Diagnostik und Klassifikation. Alle Patientinnen erhielten Carboplatin AUC 5 über 3 h i.v. für insgesamt 6 Zyklen alle 3 Wochen. Es wurden nur Patientinnen erfasst, welche die Chemotherapie vollständig abgeschlossen hatten.*

### 3.2. DNA-Suspension

Nach Auswahl der Zellkulturen entsprechend der Qualität ihrer Chromosomenpräparation wurden DNA-Suspensionen aus den Primärkulturen oder den fixierten Zellen hergestellt. Hierfür erfolgte die Einweisung durch Mitarbeiter des onkologischen Labors auf eine SOP zur DNA-Gewinnung im onkologischen Labor. Sie wurde entsprechend der Vorgaben im Rahmen dieser Arbeit anschließend durch die Doktorandin durchgeführt.

Für die Gewinnung von DNA aus Zellkulturen wurde das Gentra Puregene Cell Kit von Qiagen benutzt und analog zum Gentra Puregene Handbook Third Edition April 2010 verwendet.

Hierin enthalten waren folgende gebrauchsfertige Lösungen:

1. Cell Lysis Solution (Qiagen 1045696)
2. RNase Lösung (im Kühlschrank bei 4 °C gelagert; Qiagen 158922)
3. Protein Precipitation Solution (Qiagen 1045697)
4. DNA Hydration Solution (Qiagen 1045698)

Entsprechend der angeführten Vorgaben wurde aus den vorhandenen Zellkulturen aus jeweils mindestens  $1\text{-}2 \times 10^6$  Zellen (es sollte ein deutlich erkennbares Pellet in dem jeweiligen Eppendorf-Tube vorhanden sein) DNA gewonnen:

Zunächst wurden der Schüttelinkubator für Eppendorf-Tubes auf  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  und das Wasserbad auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt und die adhärenenten Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin, um die Zellen innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur abzulösen. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 ml RPMI-Standardmedium die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellen in ein 50ml-Röhrchen überführt. Bei 1350 rpm wurden die Zellen anschließend 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und die Zellen im Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer (Hämatocytometer) gezählt und auf  $1\text{-}2 \times 10^6$  eingestellt. Die entsprechenden Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit 1,5 ml Medium überführt und 5 s bei 13-16000 g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20  $\mu\text{l}$  abgesaugt, die Zellen gevortext und erneut resuspendiert.

Danach wurden 300  $\mu\text{l}$  Cell Lysis Solution zugegeben und 10 s bei höchstem Level gevortext. Sollten die Zellbestandteile sich verklumpt haben, dann wurden sie im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert bis sie sich gelöst hatten. Durch Zugabe von 1,5  $\mu\text{l}$  RNase Lösung, 25x Umschwenken und 5 min Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die vorhandene RNA entfernt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  Protein Precipitation Solution zugegeben und die Lösung für 20 s auf höchstem Level gevortext. Durch die beschriebene Behandlung erfolgten die Zelllyse sowie die Entfernung von RNA und Proteinen.

Anschließend wurde die Lösung für 1 min bei 13-16000 g zentrifugiert und mit 300  $\mu\text{l}$  Isopropanol in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert. Der Überstand aus dem anderen Röhrchen wurde hierbei sehr vorsichtig ohne das Pellet zu berühren überführt und dann ca. 50x geschwenkt. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation für 1 min bei 13-16000 g. Die gereinigte und ausgefällte DNA war nun als kleines weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig auf Filterpapier entfernt und dabei genauestens auf das Pellet geachtet, sodass dieses nicht ausversehen mit ausgeschüttet wurde. Danach wurden 300  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol hinzugefügt und durch mehrmaliges Schwenken des Röhrchens das Pellet gewaschen. Jetzt wurde erneut 1 min bei 13-16000 g zentrifugiert, der entstandene

Überstand vorsichtig entfernt und das Röhrchen 5 s auf Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde es für weitere 5 min luftgetrocknet und hierbei wurde darauf geachtet, es nicht zu übertrocknen. Dann wurden 200 µl DNA Hydration Solution zugegeben und die Lösung 5 s bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.

Bei 65 °C wurde die DNA dann 1 h geschüttelt, um sich zu lösen, und dann über Nacht weiter bei Raumtemperatur geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde dann im UV/VIS-Spektrometer der DNA-Gehalt als Elektronenabsorptionsspektroskopie gemessen und die Lösung zur Aufbewahrung in eine Lagerbox (4 °C) überführt. Die gereinigte DNA hat am Ende typischerweise eine Ratio (A260/A280) zwischen 1.7 und 1.9, ist bis zu 200 kb groß und kann aufbewahrt werden bei +8 °C, -20 °C oder -80 °C.

Die gewonnene DNA wurde zur Authentifikation mittels STR-Analyse (Huang et al. 2016) sowie in der Arbeitsgruppe für eine weitere Differenzierung der gefundenen Aberrationen mit Hilfe einer array comparative genomic hybridization (aCGH) verwendet (Rohwer et al. 2018).

### **3.3. STR-Marker**

Durch den Vergleich von bestimmten short-tandem-repeats, sogenannten STR-Markern, wurden die ausgewählten Zellkulturen auf ihre individuelle Patientenzugehörigkeit, d.h. die Abwesenheit anderer bekannter Zelllinien überprüft. Short tandem repeats sind repetitive DNA-Sequenzen mit einer Länge von einigen Hundert Basenpaaren, welche lebenslang eine hohe Stabilität aufweisen und individuell absolut unterschiedlich sind. Jeder STR Locus ist sehr polymorph und zeigt deutliche Längenunterschiede mit unterschiedlich häufiger Wiederholung der repetitiven Sequenzen, was als sogenannter *calling code* bezeichnet wird. Sie erlauben eine zielgenaue Unterscheidung von Individuen und sind eine kostengünstige Möglichkeit, Zellen ihrem genetischen Ursprung zuzuordnen.

Nach wie vor stellt die Verunreinigung mit verschiedenen Zelllinien bei der Herstellung von Zellkulturen ein großes Problem dar. Erst kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe des Onkologischen Labors das Verfahren als effizient zur Vermeidung von Kontaminationen bei Primärkulturzellen des Ovarialkarzinoms gezeigt (Huang et al. 2016).



Nach entsprechender labortechnischer Einweisung auf die *SOP short tandem repeat profiling* sowie der *SOP STR data analysis* wurden die Zellkulturen von 9 Patientinnen nach dem vorliegenden Standard des onkologischen Labors untersucht: Zunächst wurde mit Hilfe des AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit die vorhandene DNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Das AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit enthält gebrauchsfertig:

1. AmpFISTR® Identifiler® Master Mix
2. AmpFISTR® Identifiler® Control DNA 9947A
3. AmpFISTR® Identifiler® Primer Set

Hierzu wurde das erworbene Kit zunächst bei -20 °C bis zur endgültigen Verwendung gelagert. Sobald das Kit angebrochen wurde, wurden alle vorhandenen Reagenzien aufgetaut und bei 2- 8 °C gelagert. Ein erneutes Einfrieren sollte danach unterbleiben. Die DNA wurde zunächst quantifiziert und sollte für das Kit optimaler Weise 2,5 ng in 25 µl für 28 PCR Zyklen enthalten. Allerdings können zum Beispiel auch Proben mit 5 ng/µl bei -20 °C vorgehalten und bei Bedarf analysiert werden. Da der im Labor vorhandene 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems über vier Kapillaren verfügt, empfiehlt es sich bei der Durchführung der Analyse ein Vielfaches von 4 an Proben zu untersuchen. Jeder Durchlauf benötigt mindestens eine Allelleiter, eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle. Die Negativkontrolle enthielt gar keine DNA und die Positivkontrolle DNA, welche von einem Mitarbeiter des Onkologischen Labors zur Verfügung gestellt worden war. Sollten mehr als 48 Proben untersucht werden empfehlen sich zwei Allelleitern. Daraus ergibt sich folgende zu berechnende Probenanzahl:

Anzahl mögliche DNA-Tests (S) = totale Probenanzahl (T) - positiv Kontrolle (P) – negativ Kontrolle (N) – eine oder zwei Allelleitern (A).

Für jede Reaktion werden von dem AmpFISTR® Identifiler® Master Mix 10 µl benötigt und die insgesamt benötigte Menge in ein Polypropylene-Röhrchen gefüllt, 3 s gevortext und kurz zentrifugiert, um dann jeweils 15 µl der Reaktionslösung in die entsprechenden PCR-Röhrchen zu füllen. Die Positivkontrolle enthält 10 µl der 9947A Vergleichs-DNA mit einer Konzentration von 0,1 ng/µl. Die Negativkontrolle enthält 10 µl MilliQ Wasser und die zu untersuchenden Proben jeweils 9,5 µl MilliQ Wasser und 0,5 µl DNA Lösung mit einer Konzentration von 5 ng/µl.

Nun wurden die entsprechenden Proben zu der PCR Reaktionslösung hinzugefügt, sodass jedes PCR-Röhrchen insgesamt 25 µl Lösung enthielt.

Anschließend wurden die Röhrchen fest verschlossen und in den Thermo Cycler gesteckt, die Verschlusskappe erhitzt und folgende PCR Zyklen eingestellt:

1. 95 °C für 11 min
2. 94 °C für 20 s
3. 59 °C für 3 min
4. Ab Schritt 2; 28 Wiederholungen
5. 60 °C für 10 min
6. 4 °C anhaltend

Die gesamte PCR dauerte 2 h 30 min, anschließend konnten die Proben bei 4 °C aufbewahrt werden. Vor der Verwendung in der Elektrophorese sollten die Proben einmalig gevortext und kurz zentrifugiert werden und in den anschließenden Schritten gut auf das vorhandene Pellet geachtet werden.

Im 3130 Genetic analyzer wurden pro Probe auf der 96-Well Multiply-PCR-Platte 11,7 µl Hi-Di™ Formamide und 0,3 µl GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard hinzugefügt und mit 0,5 µl PCR Produkt der jeweiligen Probe inklusive Positivkontrolle, Negativkontrolle und Allelleitern versetzt. Die Platte wurde dann mit entsprechendem Septum versiegelt und kurz bei maximal 1000 rpm zentrifugiert. Im Thermo Cycler wurde die Platte anschließend 3 min bei 95 °C denaturiert und unmittelbar danach für 3 min auf Eis gestellt.

Nun folgte die Elektrophorese mit dem 3130 Genetic Analyzer entsprechend computergestützten Vorgaben des Gerätes für eine neue Platte unter dem Protokoll „FragmentAnalysis36\_POP7\_sean\_Forensic“:

Index	Amount
Injection voltage	3000 volts
Injection time	10 seconds
Voltage number steps	40
Data delay time	1 second
Run time	1200 seconds

*Tabelle 2: Index= was soll durchgeführt werden, Amount= Wiederholungsrate. Für 4 Proben benötigt das Gerät ungefähr 35 min.*

Nach der Elektrophorese erstellte das Datenverarbeitungsprogramm GeneMapper® ID Software (Version 3.2) sogenannte .fsa- Dateien und erfasste die erhobenen Daten nach dem Identifiler\_Plus\_AnalysisMethod\_v1\_forensic Protokoll wobei unter anderem Allele, Peak detector, Peak quality und quality flags erfasst wurden. Das Programm analysierte die Proben dann eigenständig und erfasste auch die Probenqualität. Einschränkungen und eine differenzierte Betrachtung unterschiedlicher Ergebnisse wurden dem GeneMapper® ID Software Versions 3.1 and 3.2 Human Identification Analysis Tutorial entnommen.

Die erhobenen STR Profile wurden elektronisch mit Daten der STR Matching Analysis Database vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig überprüft.

Im untersuchten Zellkultur-Kollektiv lag keine Verunreinigung mit bekannten Zelllinien vor, was nach jeder Kultivierung analog der oben genannten Vorgehensweise überprüft wurde.

#### **3.4. SKY-Hybridisierungsprotokoll**

Die SKY-Hybridisierung der ausgewählten Objektträger erfolgte nach dem „DNA Spectral Karyotyping Protocol WI-KIT-046.doc“ der Firma Applied Spectral Imaging Ltd., Israel.

Das dreitägige Protokoll wurde mit den oben genannten und vom Hersteller empfohlen Chemikalien, Lösungen sowie dem entsprechenden CAD-Kit durchgeführt. Obwohl alle Objektträger gesichtet worden waren und der Hersteller für weniger verunreinigte Objektträger kein Pepsin-Verdau vorsah, wurden alle Proben mit Pepsin entsprechend vorbehandelt. Trotz mehrfachen Waschens und Überprüfung im Phasenkontrast-Mikroskop musste weiterhin mit einigen die spätere Auswertung einschränkenden Verunreinigungen gerechnet werden.

Wenn auf dem Objektträger offensichtlich nur wenige geeignete Metaphasen vorhanden waren, wurde über ein Gitternetz eine Zeichnung mit entsprechend markierten Metaphasen angefertigt, um die erneute Suche zur späteren SKY-Auswertung zu erleichtern.

### 3.4.1. Tag 1

#### 3.4.1.1. Pepsinverdau

Zunächst wurden 50 ml 0,01 M HCl-Lösung in einem Objektträger-Färbetrog auf 37°C erwärmt. Dann wurden 10 µl Pepsin Stock hinzugefügt und mit der Pipette gut untergemischt. Die ausgewählten Objektträger, pro Hybridisierungsdurchlauf maximal 4 Stück, wurden 4 min in der Pepsin-Lösung behandelt. Anschließend erfolgte die Reinigung in 1xPBS für 5 min durch Wechsel der Flüssigkeit im Färbetrog bei Raumtemperatur. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Anschließend erfolgte ein vorbereitender weiterer Waschschrift mit 1xPBS/MgCl<sub>2</sub> Lösung, bestehend aus 1xPBS mit 5 % 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Behandlung mit Formaldehyd-Lösung, welche aus 2,7 ml 37 % Formaldehyd-Lösung und 100 ml der zuvor bereits angesetzten PBS/MgCl<sub>2</sub>-Lösung bestand. Danach erfolgte nochmal eine Reinigung mit 1xPBS für 5 min. Hiernach wurden die Objektträger nacheinander in 70 %, 80 % und 100 % Ethanol jeweils 2 min vollständig dehydriert und Luft getrocknet.

#### 3.4.1.2. Chromosomendenaturierung

Nach der Erwärmung von 40 ml Denaturierungslösung im Färbetrog auf 72 °C, wurden die Objektträger zügig hinzugefügt und mit einem Glasdeckel abgedeckt. Wichtig war, den Temperaturgradienten zwischen Boden und Deckel des Färbetroges beim Denaturierungsschritt möglichst gering zu halten, da die Denaturierung temperaturabhängig erfolgt. Der Denaturierungsschritt wurde nach 90 s durch Wechsel der Objektträger in die auf -20 °C gekühlte 70 % Ethanollösung sofort abgebrochen. Wichtig war die Denaturierung zeitgenau zu unterbrechen, um keine zu starke Denaturierung zu erzeugen.

Nach 2-minütiger Dehydrierung in 70 % Ethanol, erfolgten zwei weitere Dehydrierungsschritte äquivalent in 80 % und 100 % Ethanol. Darauf folgte eine vollständige Lufttrocknung.

#### 3.4.1.3. Sondendenaturierung- und hybridisierung

Die von ASI zur Verfügung gestellte DNA-Sonde wurde im Vorweg bereits zu je 10 µl aliquotiert. Die zum Teil präzipitierte Sonde wurde mit einer Pipettenspitze

aufgemischt und im 80 °C Wasserbad 7 min denaturiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 45 min. Die 10 µl Lösung wurden dann mittig bzw. auf das für Metaphasen markierte Areal des Objektträgers getropft. Die Abdeckung erfolgte mit einem 18x18 mm<sup>2</sup> Deckglas. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen und der Rand mit Gummikleber versiegelt wurde. Es folgte die weitere Hybridisierung bei 37 °C in einer feuchten Kammer für 24-36 h.

### **3.4.2. Tag 2**

#### **3.4.2.1. Detektion**

Während der gesamten Prozedur sollten die Objektträger nass bleiben und keinem direkten Licht ausgesetzt werden. Nach der Entfernung aus der feuchten Kammer wurde der Gummikleber entfernt und es erfolgte der erste Waschschrift:

Im Färbetrog wurden die Objektträger dreimal jeweils 5 min im 45 °C Wasserbad in Waschlösung I gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschungen mit Waschlösung II ebenfalls bei 45 °C jeweils 5 min. Danach wurden die Objektträger für 1min in Waschlösung III getaucht und dann mit dem beiliegenden blocking reagent des ASI-Kits geblockt: Die Objektträger wurden mit jeweils 80 µl blocking reagent bedeckt und unter einem großen Deckglas (24x60 mm<sup>2</sup>) in einer feuchten Kammer bei 37 °C 30 min inkubiert. Die Blockung wird vom Hersteller als optional beschrieben, wir führten sie immer durch.

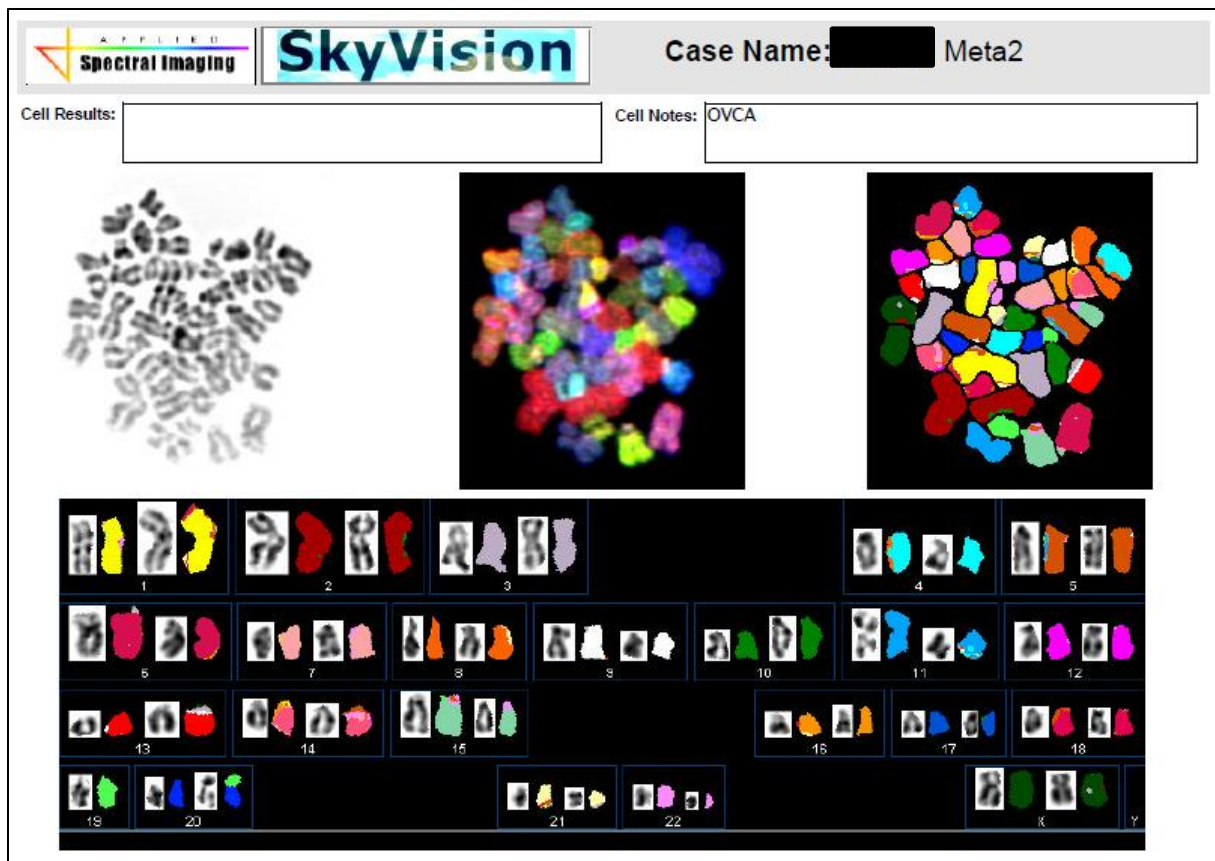
Nachfolgend erfolgte die Färbung: zunächst wurde das blocking reagent ablaufen gelassen und 80 µl Cy5 staining reagent je Objektträger zugefügt und unter einem großen Deckglas bei 37 °C für 40 min inkubiert. Danach wurde der Überschuss durch dreimalige Waschung jeweils 2 min mit Waschlösung III bei 45 °C im Färbetrog des Wasserbades entfernt. Dieselbe Färbung erfolgte nochmal mit Cy5.5 staining reagent, da Cy5.5 biotinygebunden vorliegt und mittels einer Affinität zu Streptavidin an Streptavidin-dUTP-Nukleotide bindet. Die anschließende Waschung erfolgte analog zu Cy5.

Anschließend wurde die überschüssige Waschlösung ablaufen gelassen und es folgte die finale Eindeckung mit 20 µl Anti-fade-DAPI Reagent (DAPI).

### **3.5. Auswertung mit SKY-Vision II**

Zunächst erfolgte eine Begutachtung der Hybridisierungsqualität unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hierbei traten wiederholt Verunreinigungen mit fluoreszierendem Zellmaterial auf, was dazu führte, dass einige Chromosomenpräparationen erneut mit Waschlösung aufbereitet werden mussten und bei Misserfolg des Reinigungsversuches aus dem Patientenkollektiv ausschieden. Dies führte leider zu einer deutlichen Reduktion des Patientenkollektivs und zu häufiger Versuchswiederholung. Es konnte außerdem nicht sicher eingeschätzt werden, ob nur die Aufreinigung der Chromosomenpräparation ursächlich für die fluoreszierende Überlagerung war oder auch die Herstellung der Chemikalien und Reinigung der Objektträger.

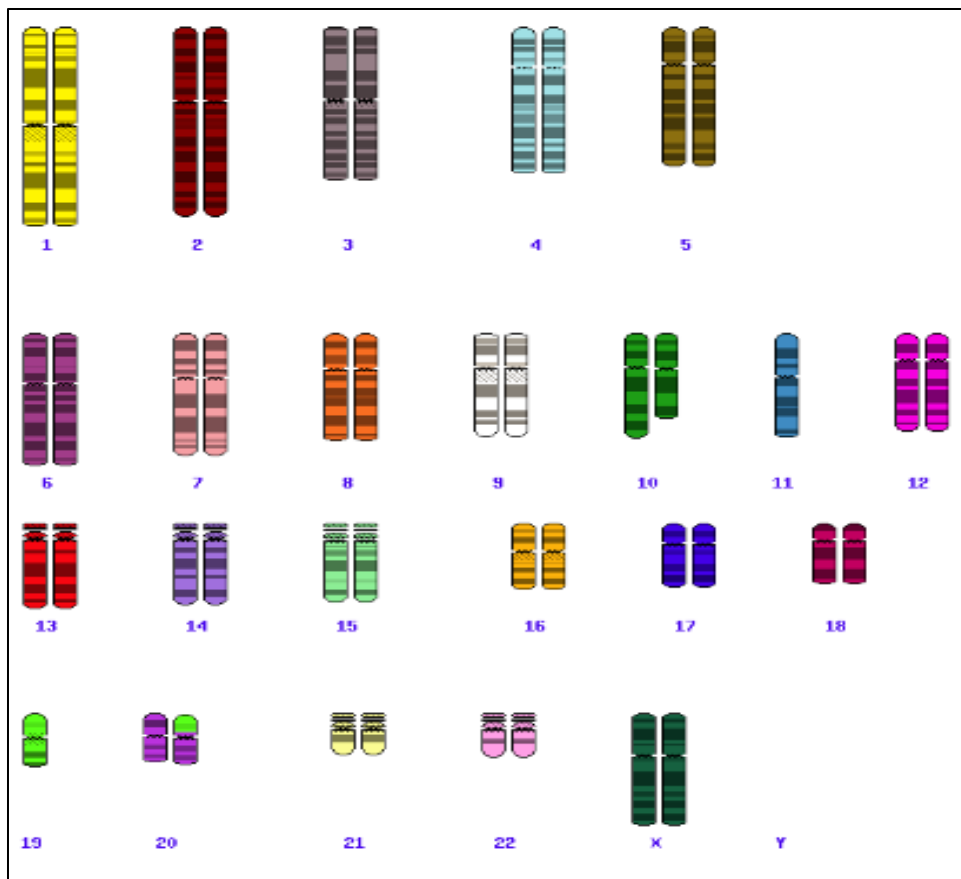
Nichtsdestotrotz konnten pro Patientin in den meisten Fällen zehn Metaphasen analysiert werden: Nach der Aufnahme durch das für die SKY-Analyse aufgerüsteten Mikroskops mit SkyVision II (ASI) und die Erstellung eines direkten Bildes durch die CCD-Kamera, wurde durch das ebenfalls von Applied Spectral Imaging Ltd. entwickelte Programm SkyView Software Version 1.6 ein Klassifizierungsbild erzeugt, welches aus den entsprechenden Farbunterschieden des direkten Bildes ein chromosomenspezifisches Bild in konventionellen und gut erkennbaren Farben errechnete (siehe Abbildung 3). Bei der entsprechenden Berechnung kam es gelegentlich zu Fehlklassifizierung aufgrund von zu geringer Spreitung und Farbtiefe, was eine manuelle Nachklassifizierung unter Zuhilfenahme des inversen DAPI-Bildes nach sich zog. Mögliche Markerchromosomen wurden unmittelbar markiert und später erst klassifiziert.



*Abbildung 3: Sogenannter Case-Report der Metaphase Nr. 2 von Patientin 1. Dargestellt ist oben links das inverse DAPI-Bild, rechts daneben das Originalbild aufgenommen durch das SkyVision-Mikroskop und ganz rechts das Klassifizierungsbild, erstellt durch das Programm SkyView. Unten ist das entsprechende Karyogramm mit der Zuordnung des inversen DAPI-Bildes und des entsprechenden Klassifizierungsbildes dargestellt. Die Korrektur erfolgte manuell am Computer. Bei Chromosom 20 liegt in dieser Metaphase eine gut erkennbare Translokation mit Anteilen von Chromosom 19 vor.*

### 3.6. Erstellung der SKY-Ideogramme

Aus den erstellten Case-Reports wurden in Microsoft Power Point Karyogramme mit einzeln dargestellten Chromosomen bzw. Derivatchromosomen erstellt, welche einen besseren Überblick über mögliche Veränderungen zeigen sollten. Die hierfür benötigten Chromosomen-Ideogramme wurden über Funktionen der Webseite SKY database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky>) erstellt. Jedes Ideogramm wurde individuell entsprechend des jeweiligen Chromosoms angepasst und eingehend mit konventionellen und direktem SKY-Bild sowie dem DAPI-Bild abgeglichen. Die einzeln erstellten Ideogramme wurden dann in einem SKY-Ideogramm (siehe Abbildung 4) zusammengefasst dargestellt und als Grundlage für die darauffolgende Klassifizierung nach ISCN genutzt.



**Abbildung 4:** SKY-Ideogramm entsprechend der weiter oben im Case-Report (Abbildung 3) dargestellten Metaphase 2 von Patientin 1. Alle Ideogramme sollten möglichst genau entsprechend den zugrundeliegenden Bildern die veränderten Chromosomen darstellen. In diesem SKY-Ideogramm sind Verluste an den q-Armen der Chromosomen 9 und 10, der Verlust eines Chromosom 11 sowie die bereits im Klassifizierungsbild gut erkennbare Translokation 19/20 zu sehen.

### 3.7. Statistik

Für die Erstellung der Statistik wurde das Programm Statistica Version 6 Software von StatSoft Inc. 2001, Hamburg, verwendet. Zunächst wurden die Ergebnisse aller Patientinnen zusammengefasst (siehe 4.1. Tabelle 4 und 8.3. Tabelle 9). Diejenigen Aberrationen, welche in den Metaphasen einer Patientin häufiger als zweimal vorkamen, wurden entsprechend grau hinterlegt und herausgearbeitet, wie graphisch in 4.2. Abbildung 6 gezeigt. Anschließend wurden die entsprechenden Aberrationen in Abhängigkeit von der Platinsensitivität der Patientin statistisch bewertet. Tabelle 5 unter 4.3. zeigt hierfür die Ausgangswerte der erfassten Veränderungen in absoluten Zahlen. Da jedoch die Wiederholungsanzahl der Aberration in den jeweiligen Metaphasen einer Patientin keinen Einfluss auf die Abhängigkeit von der



Platinsensitivität hat, zeigt Tabelle 6 unter 4.3. nur das Auftreten der Aberration an der Gesamtheit der Patientinnen.

Bei kleiner Stichprobe konnte nicht von einer Standardnormalverteilung der sich wiederholenden Aberrationen in Abhängigkeit von der Platinsensitivität ausgegangen werden, entsprechend wurde ein T-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Dieser zeigte zwar für einige Ergebnisse ein statistisch signifikantes Ergebnis mit  $p < 0,05$ , da jedoch viele Aberrationen entweder 0 oder einmal auftraten, konnte nicht von sicher intervallskalierten Daten und einer insgesamt normalverteilten Gesamtheit ausgegangen werden.

Es wurde stattdessen ein Chi-Quadrat-Verteilungstest nach Pearson über alle Ergebnisse beider Gruppen durchgeführt (Pearson 1992). Alle Ergebnisse aus 4.3. Tabelle 5 wurden hierfür mittels der Statistik-Software einem  $\chi^2$ -Verteilungstest analog zur entsprechenden Kontingenztafel unterzogen. Auch hier waren bei einigen Variablen, in diesem Fall den Derivativchromosomen, weniger als 5 Fälle pro Aberration aufgetreten, sodass die Testvoraussetzungen nicht erfüllt waren.

Es wurde auf weitere Hypothesentests verzichtet und die Ergebnisse im Weiteren rein deskriptiv und möglichst graphisch anschaulich dargestellt.

## 4. Ergebnisse

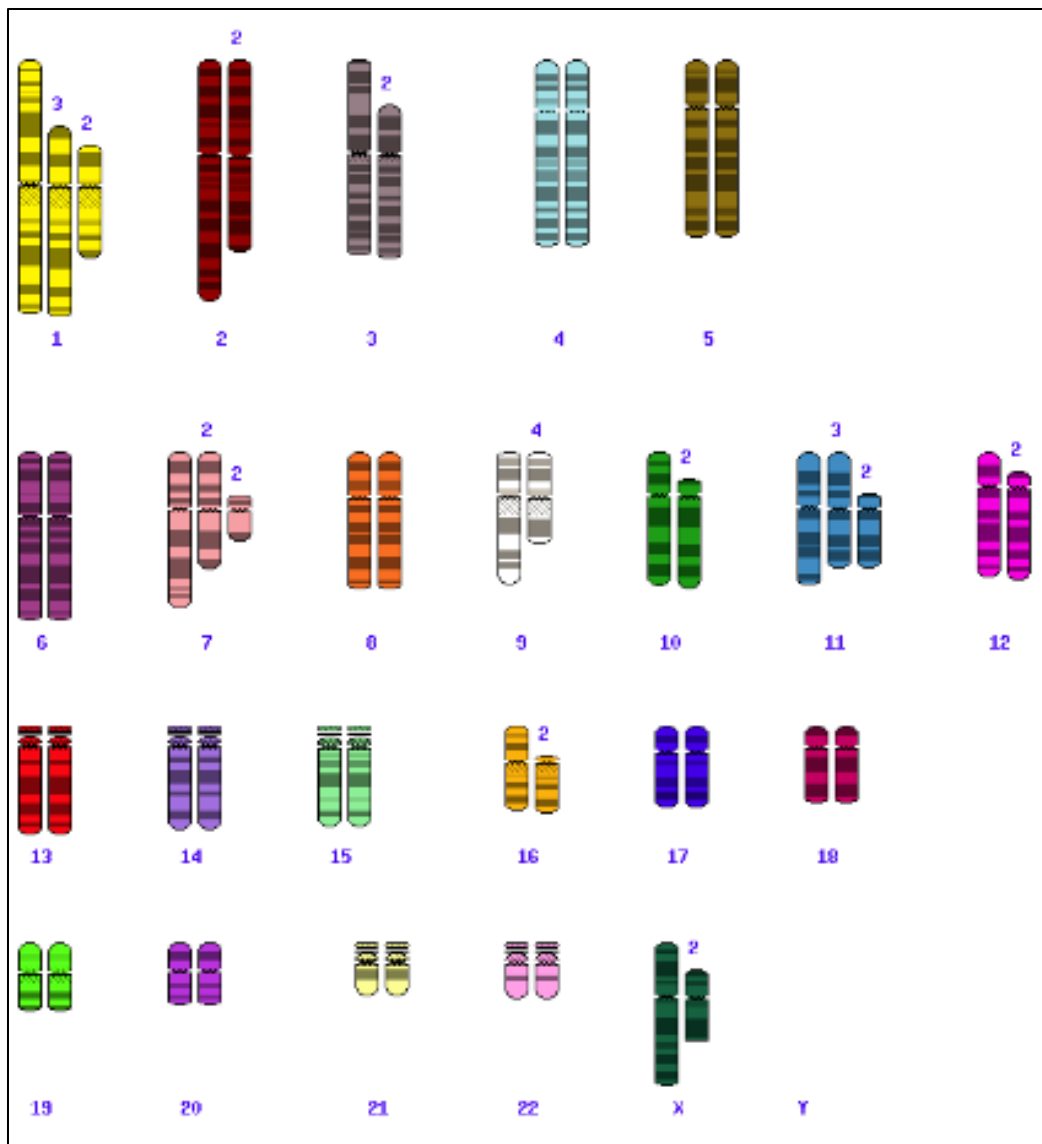
### 4.1. Auswertung der Ergebnisse am Beispiel von Patientin 1

Insgesamt konnten 562 unterschiedliche Chromosomenveränderungen in den analysierten Metaphasen erfasst werden. Die Auswertung der Ergebnisse wird im Folgenden beispielhaft an dem Fall einer Patientin erläutert. Die einzelnen Ergebnisse aller analysierten Patientinnen sind vollständig im Anhang unter 8.3. Tabelle 9 aufgelistet.

Nachdem für jede der neun Patientinnen pro Metaphase ein einzelnes SKY-Ideogramm erstellt worden war, wurden alle SKY-Ideogramme der jeweiligen Patientin zu einem individuellen Gesamtergebnis, einem sogenannten *composite SKY-ideogram*, wie in Abbildung 5 gezeigt, zusammengefasst. Anschließend wurden alle erkannten chromosomalen Veränderungen tabellarisch beschrieben. Hierfür wurde das *International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN) in aktueller Fassung genutzt. Eine Zusammenfassung der Nomenklatur nach ISCN ist im Anhang unter 8.2. Abbildung 11 aufgelistet.

Diese sehr aufwendige Analyse wurde benötigt, um eine anschließende Häufigkeitsverteilung zu erstellen. Am Beispiel von Patientin 1 zeigt nachfolgend die tabellarische Analyse (Tabelle 3) welche chromosomalen Veränderungen in einer einzelnen Metaphase auftraten. Die zusammenfassende Beschreibung dieser Metaphase nach ISCN lautet beispielsweise „46<2n+>,XX,der(10)del(10)(q24), der(11)del(11) (p14q14), 19, der(20)t(19;20) (p13;p11.2)“.

Nach der jeweils individuellen Beschreibung der analysierten Metaphasen, wurden die entsprechenden Ergebnisse pro Patientin tabellarisch zusammengefasst, um sich wiederholende Ereignisse zu erfassen und einen ersten Eindruck für ihre Relevanz zu erheben. Eine Zusammenfassung über alle analysierten Metaphasen von Patientin 1 zeigt Tabelle 4. Bei dieser Patientin wurden zunächst mehr als 10 Metaphasen analysiert, um eine höhere Sicherheit über die Einschätzung der Metaphasequalität zu gewinnen. In die statistische Analyse wurden jedoch, wie in allen anderen Fällen, nur die 10 qualitativ besten Metaphasen mit einbezogen.



**Abbildung 5:** composite SKY-ideogram von Patientin 1. Die Zahlen über den jeweiligen Chromosomen zeigen wie häufig in den 10 erfassten Metaphasen pro Fall entsprechende Veränderungen auftraten. Zum Beispiel traten bei der dargestellten Patientin bei Chromosom 2 in zwei Metaphasen Verluste an einem q-Arm auf. Ist dagegen keine Zahl vorhanden und sind zwei normal konfigurierte Chromosomen dargestellt, so konnten keine Veränderungen gegenüber einer normalen Metaphase dargestellt werden. Hier zum Beispiel bei den Chromosomen 4 und 5.

Chromosomennummer	Derivatvchromosom 1	Derivatvchromosom 2
1	der(1)	der(1)
2	der(2)	der(2)
3	der(3)	der(3)
4	der(4)	der(4)
5	der(5)	der(5)
6	der(6)	der(6)
7	der(7)	der(7)

8	der(8)	der(8)
9	der(9)	der(9)del(9)(q22)
10	der(10)	der(10)del(10)(q24)
11	der(11)	der(11) del(11) (p14q14)
12	der(12)	der(12)
13	der(13)	der(13)
14	der(14)	der(14)
15	der(15)	der(15)
16	der(16)	der(16)
17	der(17)	der(17)
18	der(18)	der(18)
19	der(19)	der(19)
20	der(20)	der(20) t(19;20) (p13;p11.2)
21	der(21)	der(21)
22	der(22)	der(22)
X	der(X)	der(X)

**Tabelle 3:** ISCN Klassifizierung von Patientin 1 Metaphase 2 aus Pat. 1\_02Kar.pptx.

Zum besseren Verständnis ist in der linken Spalte die normale Chromosomenbezeichnung aufgelistet. In der mittleren Spalte ist in diesem Fall ein Derivatchromosom aufgelistet ohne Veränderungen. Es handelt sich also um das normale Chromosom der entsprechenden Nummer. In der rechten Spalte sind bei den meisten Chromosomen ebenfalls keine Veränderungen aufgefallen, außer bei 4 Stück, deren entsprechende ISCN-Nomenklatur ist aufgeführt. Hierzu ist insbesondere der Vergleich des Klassifizierungsbildes mit dem inversen DAPI-Bild notwendig (siehe 3.5. Abbildung 3 und 3.6. Abbildung 4). Beispielsweise wird die makroskopisch gut erkennbare Translokation der Chromosomen 19 und 20 als eine Translokation des p-Armes von Chromosom 19 ab p13 auf den p-Arm von Chromosom 20 ab p11.2 beschrieben. Die Gesamtbeschreibung der Metaphase ist

46<2n+>/,XX,der(10)del(10)(q24),der(11)del(11)(p14q14),19,der(20)t(19;20)(p13;p11.2).

**Grau** hinterlegt sind alle in den Metaphasen der Patientin wiederholt aufgetretenen Veränderungen, welche dann zusammengefasst in der unten folgenden Tabelle 4 dargestellt werden. In diesem Fall bestehend aus 12 Metaphasen, welche zuvor entsprechend Tabelle 3 erfasst wurden.

<b>Patientin 1 Zusammenfassung</b>	Met. 01	02	03	04	05	07	08	09	10	11	12	16
<b>der(1)</b>	1	2	0	2	0	2	1	1	1	0	2	0
der(1)del(1)(p13)												2
der(1)del(1)(p21)			1									
der(1)del(1)(p21q31)			3									
der(1)del(1)(p22)										1		

der(1)del(1)(p22q31)										1	1	
der(1)del(1)(p31)	1							1		1		
der(1)del(1)(p31q21)					1							
der(1)del(1)(p31q31)								1				
der(1)del(1)(p34q21)												1
der(1)del(1)(p34q31)												1
der(1)del(1)(q21)										1		
der(1)del(1)(q32)					1							
<b>der(2)</b>	1	2	2	2	0	1	0	2	1	1	0	2
der(2)del(2)(p13)							2					
der(2)t(2,12)(p13,q12)											1	
der(2)del(2)(p22)					1							
der(2)del(2)(p34q24)					1							
der(2)del(2)(p34q42)					1							
der(2)del(2)(q13)											1	
der(2)del(2)(q32)						1					1	
der(2)del(2)(q33)										1		
<b>der(3)</b>	0	2	2	2	0	1	2	1	2	1	2	2
der(3)del(3)(p14)										1		
der(3)del(3)(p14q24)								1				
der(3)del(3)(p21)					1	1						
der(3)del(3)(p21q25)					1							
der(3)del(3)(p21q26.1)											1	
<b>der(4)</b>	2	2	2	2	0	1	1	2	1	2	1	2
der(4)del(4)(p13)											1	
der(4)del(4)(p14q25)					1							
der(4)del(4)(p14q21)						1						
der(4)del(4)(q31)					1							
<b>der(5)</b>	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1
der(5)del(5)(p14)						1						
der(5)del(5)(q22)			1									
<b>der(6)</b>	2	2	0	2	0	1	2	1	1	2	2	2
der(6)del(6)(p11)	1											
der(6)del(6)(p21.1q21)								1				
der(6)del(6)(p21)			1									
der(6)del(6)(p21q23)						1						
der(6)del(6)(p22q21)					1							
der(6)del(6)(p22q22)					1							
der(6)del(6)(q23)			1									
<b>der(7)</b>	0	2	0	2	0	1	0	1	0	1	1	1
der(7)del(7)(p12)									1			
der(7)del(7)(p13)										1	1	
der(7)del(7)(p13q21)					2							

der(7)del(7)(p15)			1									
der(7)del(7)(q11)	2											
der(7)del(7)(q31)						1	1					
der(7)t(7,22)(q31,q12)							1					
<b>der(8)</b>	1	2	2	2	2	2	1	2	3	1	1	2
der(8)del(8)(p21q22)											1	
der(8)del(8)(q22)										1		
<b>der(9)</b>	1	1	1	2	0	1	0	2	2	2	2	1
der(9)del(9)(p12)	1											
der(9)del(9)(q22)		1	1		1	1						
der(9)del(9)(q32)	1											
<b>der(10)</b>	1	1	2	2	2	2	2	1	0	1	2	1
der(10)t(10,10)(p11,q11)									1			
der(10)del(10)(p12)									1	1		
der(10)del(10)(p13)	2											
der(10)i(10)(q)	1											
der(10)del(10)(q24)		1										
<b>der(11)</b>	0	1	1	2	1	2	1	0	1	1	2	1
der(11)del(11) (p11,q14)	1											
der(11)del(11) (p12q23)						1	1					
der(11)del(11) (p14q14)		1										
der(11)del(10) (p14,q22)	3											
der(11)del(11)(q12)									1			
der(11)del(11)(q23)			1		1			1				
<b>der(12)</b>	1	2	2	2	0	1	2	2	2	1	0	1
der(12)del(12)(p11)						1						
der(12)del(12) (p11q21)							1					
der(12)del(12)(p12)	1									1		
der(12)del(12)(q12)											1	
der(12)del(12)(q22)					2							
<b>der(13)</b>	0	2	2	2	1	2	0	0	2	2	2	1
der(13)i(13)(p11)												
der(13)del(13)(q22)								1				
der(13)t(9,13)(p12p11)							1					
der(13)del(13)(q21)					2							
der(13)del(13)(q22)								1				
<b>der(14)</b>	0	2	2	2	2	2	1	0	3	1	2	2
der(14)del(14)(q22)								2				

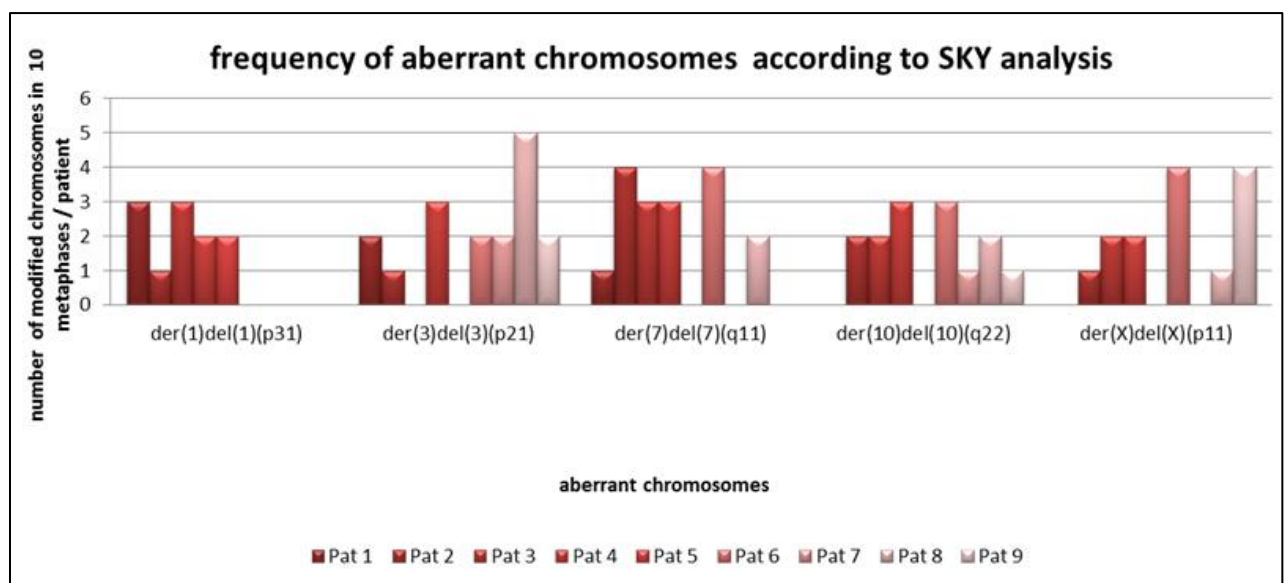
der(14)del(14)(q24)										1		
<b>der(15)</b>	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	2	1
der(15)t(15;22) (q13;11.2)			1									
der(15)del(15)(q22)	1											
<b>der(16)</b>	0	2	1	2	0	2	1	2	4	2	1	2
der(16)del(16)(p11)	3											
der(16)del(16)(p11.2)			1		2							
der(16)del(16)(q22)							1					
<b>der(17)</b>	0	2	1	2	2	2	0	2	1	2	2	2
der(17)del(17)(p11.2)			1									
<b>der(18)</b>	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
der(18)del(18)(p11.2)			1									
<b>der(19)</b>	2	1	2	2	2	2	0	1	2	1	2	2
der(19)del(19)(q13.1)										1		
<b>der(20)</b>	1	1	2	2	1	1	1	0	0	2	2	1
der(20)del(20)(p12)	1											
der(20)t(9;20) (p12;p12)								1				
der(20)t(19;20) (p13;p11.2)		1										
<b>der(21)</b>	1	2	1	2	0	2	1	1	2	2	2	0
<b>der(22)</b>	2	2	2	1	2	1	0	2	2	2	1	1
der(22)t(19;22) (q13.3q13)							2					
<b>der(X)</b>	0	2	1	2	0	1	1	1	2	2	0	1
der(X)del(X)(p11.3)			1									
der(X)del(X)(p21q21)									1			
der(X)del(X)(p21q22)					2						1	
der(X)del(X)(q22)								1				

Tabelle 4: Zusammenfassung aller erfassten chromosomalen Veränderung aus den analysierten Metaphasen von Patientin 1. Oben sind die individuellen Nummern der Metaphasen aufgelistet, darunter jeweils die Häufigkeit des beschriebenen Chromosoms in dieser Metaphase. Alle durch das Mikroskop aufgenommenen Metaphasen erhielten aufsteigende Nummern, unabhängig davon, ob sie in die weiterführende Analyse einbezogen oder wegen mangelnder Qualität verworfen wurden. Es traten in Patientin 1 zum Beispiel in Chromosom 1 insgesamt 12 verschiedene Veränderungen auf, wobei nur die grau hinterlegten Veränderungen in mehr als einer Metaphase dieses Falles auftraten und somit Zugang in die anschließende statistische Auswertung nahmen.

## 4.2. Häufigkeitsverteilung

Abschließend wurde eine Häufigkeitsverteilung unter den gesammelten Gesamtergebnissen der neun Patientinnen erhoben. Hierfür wurden nur Veränderungen mit einbezogen, die, wie in Tabelle 4 gezeigt, in mindestens zwei Metaphasen in einem Patientenfall auftraten. Bei einigen Patienten traten die Veränderung zum Teil gar nicht, einmalig oder mehrfach auf. Zum Beispiel traten die Veränderungen  $\text{der}(1)\text{del}(1)(\text{p}31)$ ,  $\text{der}(3)\text{del}(3)(\text{p}21)$ ,  $\text{der}(7)\text{del}(7)(\text{p}31)$ ,  $\text{der}(10)\text{del}(10)(\text{q}22)$ , und  $\text{der}(\text{X})\text{del}(\text{X})(\text{p}11)$  gehäuft auf.

Abbildung 6 zeigt in einem Diagramm die Häufigkeitsverteilung wie beispielsweise eine Veränderung von Chromosom 1, hier  $\text{der}(1)\text{del}(1)(\text{p}31)$ , welche in fünf von neun Metaphasen insgesamt 11-mal auftritt. Die mit Abstand häufigsten auftretenden Aberrationen waren  $\text{der}(7)\text{del}(7)(\text{q}11)$ , welche in 6 von 9 Metaphasen insgesamt 17-mal identifiziert wurde, und  $\text{der}(3)\text{del}(3)(\text{p}21)$ , welche in 7 von 9 Metaphasen ebenfalls 17-mal auftrat.



**Abbildung 6:** Häufigkeitsverteilung wiederkehrender chromosomaler Veränderungen entnommen aus (Rohwer et al. 2018). Auf der x-Achse sind die fünf häufigsten chromosomalen Veränderungen aufgeführt, auf der y-Achse die absolute Anzahl der Metaphasen pro Patientin, welche die entsprechenden Aberrationen enthielten. Die Patientinnen sind entsprechend der Legende unten farblich markiert.



### 4.3. Korrelation mit der Platinsensibilität

Nachdem die erfassten chromosomalen Veränderungen einer Häufigkeitsverteilung unterzogen worden waren, wurden sie in Zusammenhang mit der Effektivität der Platintherapie bei der entsprechenden Patientin gesetzt. Hierzu wurde die untersuchte Kohorte in eine Gruppe von Patientinnen mit besserem nicht refraktärem Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie, welche ein Rezidiv später als sechs Monate nach Beendigung der Therapie bekam, und in eine weitere Gruppe unterteilt, welche ein Rezidiv innerhalb von sechs Monaten bekam und somit ein schlechteres Ansprechen zeigte. Die besser ansprechende Gruppe enthielt Patientinnen mit einem sensitiven oder intermediären Ansprechen, sie wurden als mindestens intermediär bzw. nicht-refraktär zusammengefasst. Bei der Gruppe der refraktär ansprechenden Patientinnen wurde ebenfalls nicht zwischen einem sehr frühzeitigen Wiederauftreten unter Chemotherapie und einem etwas späteren Auftreten, also zwischen resistenten und refraktären Verläufen unterschieden, sie wurden unter refraktär zusammengefasst. Dies entspricht wie in der Einleitung unter 1.1.4. erläutert formal der aktuellen leitliniengerechten Einteilung.

Tabelle 5 zeigt die Aufteilung der Patientinnen in die zwei benötigten Gruppen. Die sowohl in den einzelnen Ergebnissen der Patientinnen bei mindestens einer Patientin zweimal aufgetretene Aberrationen, wie in Tabelle 4 und im Anhang unter 8.3. Tabelle 9 grau hinterlegt, als auch gleichzeitig bei mehreren Patientinnen nachgewiesenen Aberrationen wurden aufgelistet.

Patientin Nr.	Platinwirkung	der(8) del(8)(q13)	der(11) del(11)(q23)	der(11) del(11)(p12q23)	der(2) del(2)(q32)
Pat 1 (interm.)	intermediär	0	3	2	2
Pat 2 (interm.)	intermediär	1	0	2	2
Pat 8 (interm.)	intermediär	2	2	0	0
Pat 4 (interm.)	intermediär	2	1	0	0
Pat 9 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	0
Pat 6 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	1
Pat 7 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	1	0	0	0
Pat 5 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	1	0	0
Pat 3 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	0

Patientin Nr.	Platinwirkung	der(12) del(12)(p12)	der(6) del(6)(q14)	der(3) del(3)(p21q21)	der(10) i(10)(q)
Pat 1 (interm.)	intermediär	2	0	0	2

Pat 2 (interm.)	intermediär	1	0	2	0
Pat 8 (interm.)	intermediär	1	2	1	1
Pat 4 (interm.)	intermediär	0	3	0	0
Pat 9 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	1	0	0
Pat 6 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	1	0	0	0
Pat 7 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	0
Pat 5 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	0
Pat 3 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	0

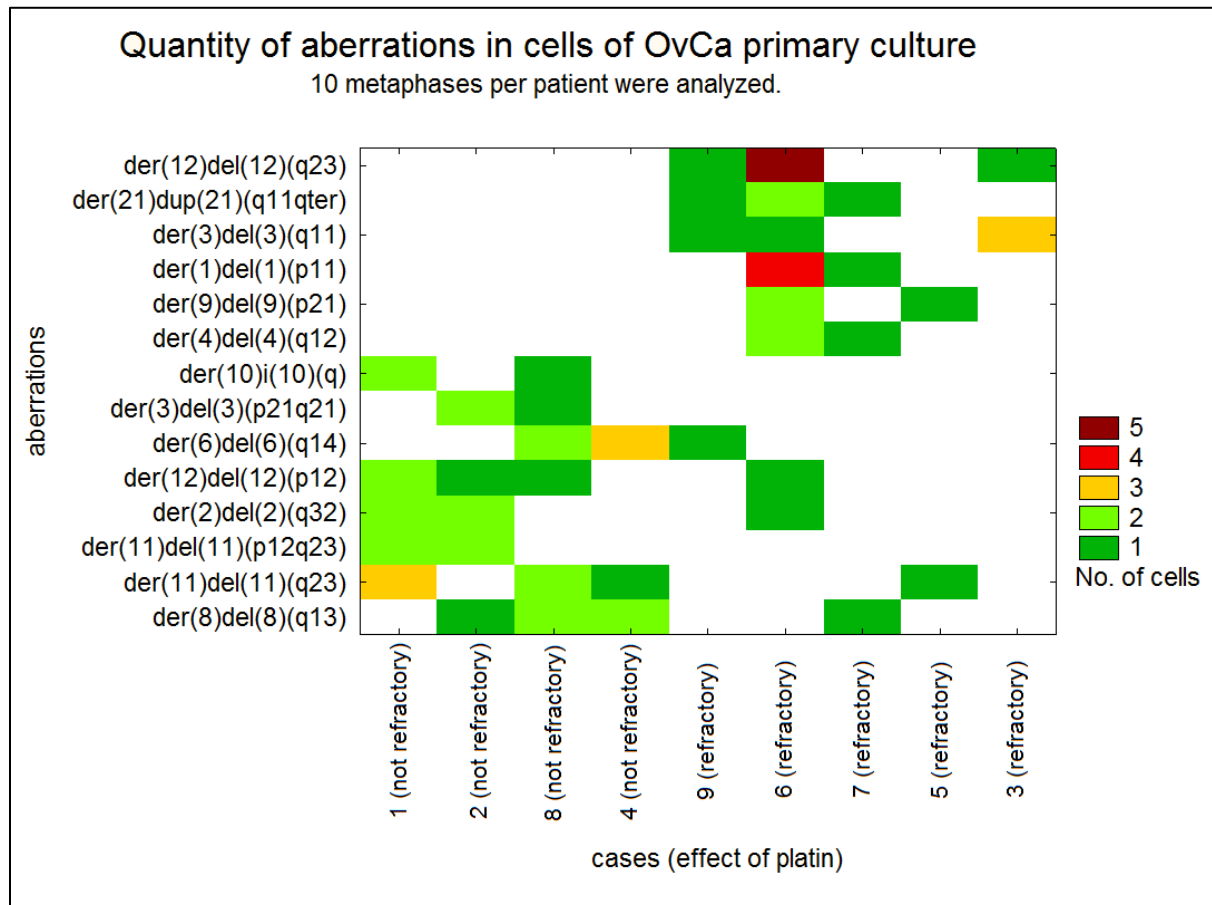
Patientin Nr.	Platinwirkung	der(4) del(4)(q12)	der(9) del(9)(p21)	der(1) del(1)(p11)	der(3) del(3)(q11)
Pat 1 (interm.)	intermediär	0	0	0	0
Pat 2 (interm.)	intermediär	0	0	0	0
Pat 8 (interm.)	intermediär	0	0	0	0
Pat 4 (interm.)	intermediär	0	0	0	0
Pat 9 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	1
Pat 6 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	2	2	4	1
Pat 7 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	1	0	1	0
Pat 5 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	1	0	0
Pat 3 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0	0	3

Patientin Nr.	Platinwirkung	der(21) dup(21)(q11qter)	der(12) del(12)(q23)
Pat 1 (interm.)	intermediär	0	0
Pat 2 (interm.)	intermediär	0	0
Pat 8 (interm.)	intermediär	0	0
Pat 4 (interm.)	intermediär	0	0
Pat 9 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	1	1
Pat 6 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	2	5
Pat 7 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	1	0
Pat 5 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	0
Pat 3 (Res. / Refr.)	Res. / Refr.	0	1

Tabelle 5: Absolute Häufigkeit der aufgetretenen Veränderungen als Zusammenfassung der Aberrationen aus den Ergebnissen der einzelnen Patientinnen. Die Tabelle wurde in vier Abschnitte unterteilt, um alle aufgeführten Veränderungen darstellen zu können.

Abbildung 7 verdeutlicht im Folgenden graphisch die Zuordnung der Aberrationen zum Therapieansprechen abhängig von der Wiederholungszahl in allen untersuchten Metaphasen. Es ist hierin deutlich eine unterschiedliche Verteilung der gehäuft auftretenden Aberrationen in den beiden Gruppen zu erkennen. Allerdings ist hier selbstverständlich zu betrachten, dass die Wiederholungsrate der Aberrationen über 10 Metaphasen pro Patientin nur einen sehr kleinen Ausschnitt der vorliegenden Tumorzellen erfasst.

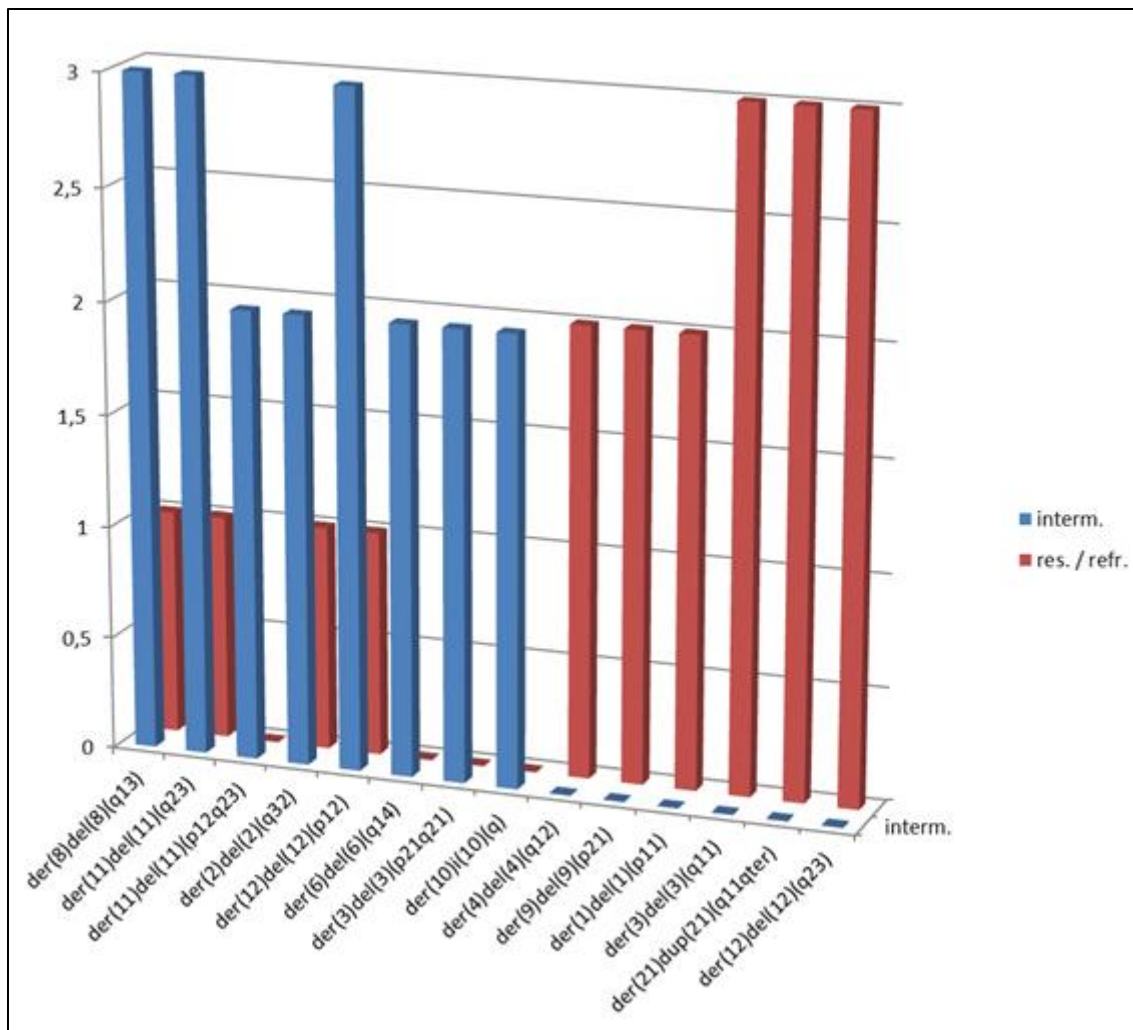
Daher wurde dann in der folgenden Tabelle 6 das Auftreten in Korrelation mit der Platinsensitivität unabhängig von der sich pro Patientin wiederholenden Anzahl erfasst. Abbildung 8 zeigt, dass auch nachdem die Wiederholungszahl pro Patientin nicht mehr in absoluten Zahlen im Auftreten in den 10 analysierten Metaphasen erfasst wird, eine Differenzierung zwischen den beiden Gruppen erkennbar bleibt.



**Abbildung 7:** Heatmap bzw. Cluster der Verteilung einiger chromosomaler Veränderungen in Abhängigkeit von deren Platinsensibilität. Auf der x-Achse sind alle neun ausgewerteten Patientinnen aufgeführt. Dabei sind auf der linken Seite jene mit einem platinsensitiven oder intermediärem (non-refractory) Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie und rechtsseitig jene mit einem platinresistenten oder refraktärem (refractory) Verlauf dargestellt. Farblich erfasst wurden die Aberrationen welche kein Mal auftraten in dunkelgrün. Häufigeres Auftreten zum Beispiel in rot. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die auf der y-Achse aufgeführten Aberrationen den jeweiligen Gruppen zuordnen lassen. Entnommen aus (Rohwer et al. 2016).

Derivatvchromosom	interm.	res. / refr.	Summe
der(8)del(8)(q13)	3	1	4
der(11)del(11)(q23)	3	1	4
der(11)del(11)(p12q23)	2	0	2
der(2)del(2)(q32)	2	1	3
der(12)del(12)(p12)	3	1	4
der(6)del(6)(q14)	2	0	2
der(3)del(3)(p21q21)	2	0	2
der(10)i(10)(q)	2	0	2
der(4)del(4)(q12)	0	2	2
der(9)del(9)(p21)	0	2	2
der(1)del(1)(p11)	0	2	2
der(3)del(3)(q11)	0	3	3
der(21)dup(21)(q11qter)	0	3	3
der(12)del(12)(q23)	0	3	3
Summe	19	19	38

***Tabelle 6:** Auftreten der entsprechenden Aberration an der Gesamtheit der Patientinnen unabhängig von der individuellen Wiederholungsanzahl in den untersuchten Metaphasen zugeteilt zum Therapieansprechen und in der Gesamtsumme. Die Zahlen aus dieser Tabelle sind graphisch dargestellt in Abbildung 8.*



**Abbildung 8:** Auf der x-Achse sind die entsprechenden chromosomalen Aberrationen aufgeführt, in Richtung z-Achse hintereinander mit blauen Balken für die Häufigkeit bei Patientinnen mit mindestens intermediärem Ansprechen und roten Balken für ein resistentes oder refraktäres Ansprechen entsprechend der in der Arbeit verwendeten alten Zuordnung des Therapieansprechens. Die Häufigkeiten des Auftretens sind auf der y-Achse aufgeführt.

Wenn man als Nullhypothese annähme, dass sich die beschriebenen Derivatvchromosomen nicht hinsichtlich ihrer Zuordnung unterscheiden und somit die Ergebnisse aus Tabelle 5 und 6 rein zufällig sind, dann ließ sich die Nullhypothese bei sehr kleiner Stichprobe im Falle dieser Arbeit lediglich durch einen  $\chi^2$ -Verteilungstest nach Pearson zum Beispiel über alle Aberrationen aus Tabelle 5 in ihrer Gesamtheit untersuchen (Pearson 1992). Er ergab sich für die Annahme, dass die abhängige Variable, also das Auftreten der entsprechenden Derivatvchromosomen in Summe über alle Patientinnen und Metaphasen entsprechend Tabelle 5, nicht zufallsverteilt ist zwar ein signifikantes Ergebnis, allerdings ist auch hier die Aussagefähigkeit des Tests beschränkt durch die zu kleine Stichprobe, da die meisten Derivatvchromosomen in den beiden Gruppen

weniger häufig als fünf Mal auftraten. Daher wurde auch dieser Test nicht weiter für die Bewertung der Ergebnisse herangezogen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich bei kleiner Stichprobe die Auswertung der Ergebnisse auf eine rein deskriptive Statistik in Form von Tabellen und Abbildungen beschränkt. Eine aussagekräftige Statistik in Form von höherwertigen statistischen Hypothesentests konnte insbesondere nicht hinsichtlich der Zuordnung eines untersuchten Derivatchromosoms zum Therapieansprechen der jeweiligen Patientin durchgeführt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. **Bewertung der eigenen Ergebnisse**

Es kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit erkannten chromosomalen Aberrationen nicht durch eine Chemotherapie beeinflusst wurden. Ein lediglich geringer Einfluss könnte durch die Anfertigung der Zellkulturen und deren Lagerung selbst entstanden sein. Ein umso erheblicherer Einfluss ist sicherlich bedingt durch die benötigte Qualität der Metaphasen, wodurch viele Patientinnen aus dem ausgewählten Kollektiv ausschieden und die untersuchte Fallzahl auf 9 Patientinnen reduziert wurde. Allerdings hat die Qualität der Metaphasearretierung hierbei keinen Einfluss auf die chromosomale Qualität sondern lediglich auf die Auswertbarkeit mit dem zur Verfügung stehenden Verfahren. Wie weiter unten beschrieben sind diese Einschränkungen für das verwendete Verfahren schon länger bekannt, allerdings stellen Zellen aus Primärtumoren aufgrund ihrer Heterogenität in der Zellanzucht wie auch in der Metaphasearretierung sicherlich eine besondere Herausforderung dar. Im Onkologischen Labor der Frauenklinik wurden diverse SOPs formuliert, um so eine höhere und gleichbleibende Qualität sicherzustellen (s. Methodenteil). Wie in einem systematischen Review beschrieben, ist diese Vorgehensweise insbesondere für die von einer guten Chromosomenpräparation abhängigen FISH-Verfahren unabdingbar (Howe et al. 2014).

Nichtsdestotrotz waren viele der primär ausgewählten Chromosomenpräparationen nicht ausreichend in der Metaphase arretiert und es ist sicherlich mit einer durch die Zellkultur bedingten Selektion zu rechnen, wenn man betrachtet, dass zunächst 34 Patientinnen eingeschlossen wurden. Weiterhin kommt es durch die Anzucht von Zellen immer zu einer natürlichen Selektion derjenigen Zellen, welche individuell ein besseres Wachstum in dem jeweiligen Kulturmedium zeigen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Patientenzugehörigkeit und der Abwesenheit bekannter Zelllinien durch die Verwendung von STR-Markern untersucht, was für die Verwendung von Primärkulturen des Ovarialkarzinoms durch unsere Arbeitsgruppe als effektiv beschrieben wurde (Huang et al. 2016). Diese Authentifizierung wird für die Verwendung jeglichen Gewebes und den erzeugten Zelllinien dringend empfohlen, da die Verunreinigung mit verschiedenen auch nicht humanen Zelllinien zum Verlust vieler wissenschaftlicher Ergebnisse führte (Barallon et al. 2010).

Die auf die Auswahl der Zellkulturen folgende Auswahl der subjektiv geeignetsten Metaphasen unter dem Mikroskop kann die Verzerrung der Ergebnisse erheblich aggravieren, insbesondere dann, wenn man betrachtet, dass bei nur 10 analysierten Metaphasen pro Patientin lediglich ein kleiner Einblick in die vorliegende genetische Variabilität des Tumors erfolgen kann. Wie die Häufigkeitsverteilung (siehe 4.2. Abbildung 6) der wiederkehrenden chromosomalen Veränderungen zeigt, konnten wir trotzdem diverse Veränderungen beschreiben, welche wie beispielsweise der(3)del(3)(p21) in Patientin 8 in 5 Metaphasen nachgewiesen werden konnte oder auch der(7)del(7)(q11), welche in den 90 untersuchten Metaphasen 16-mal auftrat. Somit wiederholten sich einige Aberrationen sowohl innerhalb der Metaphasen einer Patientin als auch patientinnenübergreifend. Insgesamt wurden Veränderungen der Chromosomen 1, 3, 7, 10 und X wiederholt beschrieben. In dieser Hinsicht wurde das primäre Ziel der Arbeit, nämlich der Nachweis wiederkehrender Aberrationen, erreicht.

In Bezug auf die Korrelation mit der Platinsensibilität konnte bedingt angenommen werden, dass die Nullhypothese verworfen werden kann. Die Gesamtheit aller Aberrationen war graphisch nicht rein zufällig verteilt, sondern abhängig vom Therapieansprechen. Allerdings war auch die Gesamtheit der Stichprobe nicht ausreichend groß, um eine Unabhängigkeit der Ergebnisse zeigen zu können. Ferner konnte keine einzelne Aberration statistischen Tests standhalten, welche eine signifikante Zuordnung zu einer Patientengruppe ermöglicht hätte.

Die zu geringe Fallzahl des untersuchten Patientenkollektivs ist ohne Frage, wie bereits beschrieben, auf eine methodische Problematik zurückzuführen. Insgesamt lassen sich die gezeigten chromosomalen Veränderung sicherlich nur als Fallstudie für eine anschließende Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs beschreiben, was durch unsere Arbeitsgruppe im Rahmen einer umfangreichen Untersuchung desselben Patientenkollektivs mit einer vergleichenden Genomhybridisierung (arrayCGH) gezeigt werden konnte, (siehe 5.3.) und (Rohwer et al. 2018).



## **5.2. Effektivität und Reliabilität SKY**

Die 24-Farben Karyotypisierung wurde 1996 erstmalig als ein Verfahren mit einer vereinfachten Differenzierung einzelner Chromosomen und höheren Sicherheit als die bis dato geläufige Giemsa-Färbung in der klinischen Diagnostik beschrieben (Schröck et al. 1996). Insbesondere die Kombination mit der Giemsa-Färbung zeigte frühzeitig eine Erhöhung von Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur klassischen Bänderungstechnik (Schröck et al. 1996), was auch anschließend in mehreren systematischen Fallstudien beschrieben werden konnte (Jalal et al. 2001). Insbesondere in der prä- und postnatalen zytogenetischen Diagnostik konnte das Verfahren bereits kurz nach seiner Entwicklung im klinischen Gebrauch durch Nachweis diverser bis dato nicht beschriebener subtiler genetischer Veränderungen vor allem unbalancierter struktureller Aberrationen und kleiner Markerchromosomen überzeugen. Die entsprechenden Veränderungen konnten in den bis zu diesem Zeitpunkt angewendeten konventionellen Färbetechniken zur Chromosomenbänderung, wenn überhaupt, nur mit einem hohen Maß an fachlicher Erfahrung erkannt werden (Haddad et al. 1998). In ähnlicher Weise wurde vermutet, dass die Anwendung in der klinischen und experimentellen Onkologie neue Möglichkeiten in der Beschreibung von komplexen Genomen verschiedener maligner Zellverbände mit sich bringen würde (Lu et al. 2000).

Im Gegensatz zu der Euphorie gegenüber diesem neuen Verfahren, beschrieb jedoch bereits Schröck et al. (1996) in ihrer ersten Publikation, dass die Auflösungstiefe des Verfahrens ähnlich der konventionellen Bänderungstechnik bei ca. 1500kbp liege und verwies hierbei darauf, dass 500kbp große Veränderung, welche submikroskopisch seien, auch mit einem Verfahren des whole chromosome painting nicht identifizierbar seien. Insbesondere Translokationen und strukturelle Rearrangements zeigten sich jedoch als mit hoher Reliabilität nachweisbar.

In der vorgelegten Arbeit zeigte sich in wiederholten Versuchen, dass nicht nur die Quantität der vorhandenen Metaphasen in Zellkulturen mit Chromosomenpräparation verschiedener Patientinnen erheblichen Schwankungen bis hin zur nicht-Verwendbarkeit unterliegen, sondern auch, dass die Verunreinigung mit verschiedenen Zellbestandteilen wie Zytoplasma ein großes Problem darstellen kann, was sich auch durch wiederholte Waschvorgänge nicht immer beheben ließ. Es ließ sich auch hier häufig nicht die Ursache für erhöhten fluoreszierenden Hintergrund, niedrige Hybridisierungsintensität und zu geringe Spreitung bei stark

kondensierten Chromosomen klären. Dies führte zu häufiger Versuchswiederholung mit hohem Probenverbrauch und erhöhten Kosten für die Neubestellung der benötigten SKY-Sonden. Nichtsdestotrotz wurde streng auf eine immer gleiche Durchführung des beschriebenen Hybridisierungsvorganges geachtet. Lediglich die Vorbereitung des Materials und die Waschschrte wurden mehrfach verändert und konnten in einigen Fällen zu einer erheblichen Verbesserung der Hybridisierungsqualität beitragen.

Im Bereich der anschließenden Auswertung erfolgte die Klassifizierung der Karyogramme immer in Kombination des Bildes der mit 24-Farben-FISH gefärbten Metaphase mit dem errechneten Klassifizierungsbild und vor allem mit dem inversen DAPI-Bild, um den Effekt des sogenannten fluorescence flaring zu reduzieren. Dieses Phänomen tritt insbesondere bei benachbart liegenden nicht-homologen Chromosomen mit vermeintlich kleinen additiven Fragmenten anderer Chromosomen als eine Überlagerung des von den Fluorophoren emittierten Lichts auf, was dann zu wiederholten Fehlklassifizierungen führen kann. Ein Vergleich mit der klassischen Bänderungstechnik des inversen DAPI-Bildes kann die Rate an fehlerhaften Interpretationen reduzieren (Lee et al. 2001).

Neben den beschriebenen methodischen Artefakten, welche auch bei der Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen sollten, ist sicherlich eine der wichtigsten Einschränkungen aller FISH-Verfahren die mangelnde Repräsentation bzw. der mangelnde Überblick über das Genom diverser Zellen eines Tumors. Dieses Problem spielt bei klinischen Fragestellungen wie in der Pränataldiagnostik sicherlich eine geringe Rolle, da außer im Falle des Vorliegens eines Mosaiks, sicherlich von einem homogenen Zellkollektiv des jeweiligen Individuums auszugehen ist. Vor allem im Bereich der Beschreibung von derivativen Chromosomen, Insertionen, komplizierten Translokationen und verschiedenen Amplifikationen wie Duplikationen zeigt sich das Verfahren bei der Identifizierung von genetisch bedingten Erkrankungen bei Kindern aktuell als sehr effizient (Imataka 2012).

Maligne Zellverbände und hier insbesondere das Ovarialkarzinom zeichnen sich jedoch durch enorme Heterogenität und evolutionäres Wachstum aus, was im Prinzip ein Verfahren benötigt, welches die genetische Vielfalt eines Tumors über die Analyse eines Vielfachen der Anzahl von 10 Metaphasen pro Fall implizieren sollte. Die gesamte Auswertung der erkannten Aberrationen gestaltete sich enorm

zeitintensiv und es konnte bis zur finalen Auswertung nicht erkannt werden, welche Veränderungen von Interesse sein könnten und welche nicht. Die anschließende Zuordnung der erfassten Veränderungen zum Chemotherapie-Ansprechen führte jedoch zu einer weiteren Untersuchung des Patientenkollektivs durch die Forschungsgruppe (siehe 5.4.).

Die SKY-Technik ist trotz der genannten Nachteile ein Verfahren, welches in aktuellen Publikationen auch im Bereich der experimentellen Onkologie zu relevanten Ergebnissen führt, wie die Gruppe um Leone et al. 2012 in Bezug auf die Untersuchung der genetischen Variabilität des Glioblastoma multiforme zeigen konnte: Das Glioblastoma multiforme stellt den häufigsten malignen hirneigenen Tumor des Erwachsenen dar und ist wie auch das Ovarialkarzinom mit einer schlechten Prognose als Folge einer Diagnose in fortgeschrittenem Stadium und genetischer Heterogenität bei bisher beschränkten Möglichkeiten in Bereich der targeted therapies verbunden. Die mittels SKY-Analyse durchgeführte Suche nach Translokationen führte zu einer weiteren Überprüfung von möglichen Amplifikationen und Deletionen im Bereich der gefundenen Bruchpunkte mittels arrayCGH und Genexpressionsarrays. Hierbei konnte mit höherer Tiefe das Expressionslevel verschiedener Gene im Bereich der mit der SKY-Technik entdeckten Bruchpunkte in gut auswertbaren Daten nachgewiesen werden. Es konnten sechs Gene in 32 Patienten signifikant einem schlechteren Überleben zugeordnet werden. Sie sollen ebenfalls als Grundlage für weiterführende Studien mit größerer Fallzahl verwendet werden (Leone et al. 2012).

In Rahmen der Arbeit wurden Zellkulturen und Chromosomenpräparationen von ursprünglich 34 Patientinnen systematisch mikroskopisch ausgewählt und vorbereitet, um DNA Suspensionen, STR-Marker und SKY-Hybridisierung anzufertigen. Dieses Kollektiv wurde bereits im Verlauf der Experimente deutlich geschmälert und es wurden noch 25 weitere hinzugefügt. Es konnten jedoch letztlich nur 9 erfolgreich untersucht werden, was lediglich 15 % aller untersuchten Proben entspricht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in dieser Arbeit angewendete Technik der Spektralen Karyotypisierung dazu geeignet ist, heterogene Tumore genetisch zu analysieren und insbesondere in der Kombination mit anderen molekulargenetischen Methoden wichtige Hinweise für weitere Studien liefern kann. In der Präimplantations- und perinatalen Diagnostik hat das Verfahren außerdem nach wie

vor einen festen Stellenwert zur Identifizierung komplex aberranter Karyotypen. Nichtsdestotrotz ist die SKY-Technik methodisch sehr aufwendig und führt somit zu relativ geringen analysierten Fallzahlen, welche eine zurückhaltende Gesamtbewertung der Ergebnisse für translationale Ansätze in der klinischen Onkologie bedingen.

### **5.3. Vergleich mit anderen Verfahren**

Durch die Arbeitsgruppe des Onkologischen Labors wurde im Rahmen eines weiteren Projektes das gleiche Patientenkollektiv aus den in dieser Arbeit beschriebenen SKY-Analysen nochmals mittels einer vergleichenden Microarray-basierten genomischen Hybridisierung (arrayCGH) im Rahmen eines Methodenvergleichs untersucht.

Die arrayCGH analysiert über Unterschiede in der Anzahl an Genkopien (copy number alterations) die Gendosis vieler verschiedener Gene sowie deren Haplotyp in den untersuchten Zellen. Sie bietet als ein molekulargenetisches Verfahren die Möglichkeit, in großem Umfang einen Überblick über verschiedene, möglicherweise auf die Platinresistenz einflussnehmende Gene des analysierten Tumors zu erfassen. Außerdem ermöglicht sie eine hohe Auflösung von über 100 Kilobasenpaaren und ist somit den von der Auflösungsfähigkeit des genutzten Mikroskops abhängigen konventionellen Bänderungstechniken wie auch den FISH-Verfahren überlegen. Eine der wichtigsten methodischen Einschränkungen ist sicherlich die Abhängigkeit von der Anzahl an copy number variations und deren korrekte Differenzierung, so können zum Beispiel hoch repetitive Sequenzen im Bereich von Zentromer und Telomer falsch amplifiziert werden (Hommelsheim et al. 2014), weswegen diese Bereiche meistens durch eine Suppression mit nicht markierter DNA (Cot-1 DNA) von der Analyse ausgeschlossen werden (Du Manoir et al. 1995). Insbesondere diese genomischen Bereiche mit hoher Dichte an repetitiven Sequenzen zeigen im Rahmen der Hybridisierung eine reduzierte Spezifität, da die entsprechenden Tripletabschnitte nicht eindeutig einer spezifischen Position zugeordnet werden können.

Eine weitere insbesondere in der Tumorforschung relevante Einschränkung besteht natürlich darin, dass balancierte Veränderungen wie Translokationen, Inversionen und Mosaike nicht erkannt werden können (Kallioniemi et al. 1994), was sicherlich

einen Nachteil gegenüber der hierfür gut geeigneten SKY-Technik darstellt und für deren Identifikation weiterhin eine Kombination mit den FISH-Verfahren notwendig sein wird.

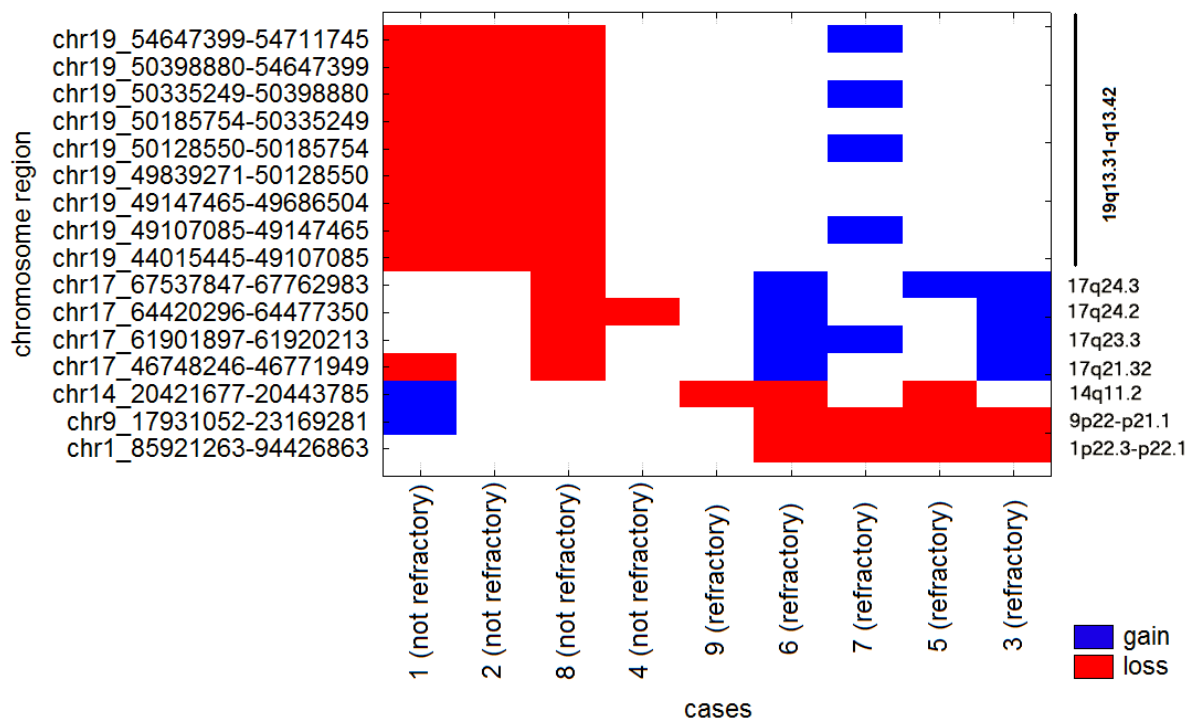
Grundsätzlich sollte in die sich an die genetische Analyse anschließenden Überlegungen bezüglich einer Relevanz der durch die arrayCGH erkannten Veränderung, immer miteinbezogen werden, dass eine Zunahme des genetischen Materials an einem bestimmten Punkt im Genom nicht konsequenter Weise eine Veränderung der hier kodierten Proteinexpression bedingen muss, da diese erheblichen Regulationen durch microRNAs und Methylierung unterliegen können (Barbarotto et al. 2008).

Diese weiterführenden Überlegungen und Ansätze betreffen natürlich alle genbasierten Verfahren und können zum Beispiel durch anschließende Überprüfung mit Expressions-Arrays und Verfahren der Immunhistochemie weiter in ihrer Relevanz differenziert werden. So konnte eine Gruppe um Bayani et al. (2011) in einer Untersuchung von 81 Chemotherapie-naiven Ovarialkarzinomen mittels FISH-Verfahren und Immunhistochemie zwar zeigen, dass Zugewinne in bestimmten Bereichen von 19q mit dem Tumorgrad korrelierten, aber nicht unbedingt zu einer Überexpression der hierin kodierten Genprodukte führten (Bayani et al. 2011).

Insgesamt konnte die Arbeitsgruppe des Onkologischen Labors der Frauenklinik zeigen, dass es einige Gemeinsamkeiten in den Ergebnissen zwischen der arrayCGH und den SKY-Analysen gab, allerdings waren diese Übereinstimmungen über alle Ergebnisse gesehen eher gering. So konnte die arrayCGH zeigen, dass Deletionen im Bereich 7q und 1p sich mit den Deletionen in den Derivatvchromosomen der(7)del(7)(q11) und der(1)del(1)(p31) aus den SKY-Analysen deckten.

Die Patientinnen, welche ein besseres Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie zeigten, fielen allerdings in der arrayCGH zum Beispiel durch Verluste von genetischem Material im Bereich 19q13.31-19q13.42 (chr19\_44015445-49686504; chr19\_49839271-54711745) auf (Rohwer et al. 2018) (siehe Abbildung 9). In Bezug auf die Anzahl der entdeckten Aneuploidien zeigte die SKY-Analyse allerdings als Einzelzellanalyse wesentlich höhere Raten an aneuploiden Veränderungen.

### Heat map of genetic gains and losses correlating with the effectiveness of platinum therapy



**Abbildung 9:** Zugewinne und Verluste in wiederholt auftretenden Aberrationen in den Ergebnissen der arrayCGH. Auf der x-Achse sind linksseitig 4 Patientinnen mit einem besseren nicht refraktären Ansprechen auf Platin und rechtsseitig 5 Patientinnen mit einem refraktären Ansprechen auf Platin dargestellt. Das Diagramm zeigt eine signifikante Aufteilung des Auftretens sich wiederholender Aberrationen gegenüber der Platinsensibilität (Rohwer et al. 2018).

Andere Forschungsgruppen konnten durch ähnliche Ansätze entsprechende Ergebnisse insbesondere im Bereich von Chromosom 19 mittels arrayCGH sowie weiteren ergänzenden Untersuchungen zeigen. Insgesamt sind verschiedenste Genabschnitte auf Chromosom 19 aktuell von hohem wissenschaftlichem Interesse, da es das Chromosom mit der höchsten Dichte an kodierenden Genbereichen und folglich von hoher evolutionsbiologischer und tumorgenetischer Relevanz ist (Grimwood et al. 2004). Dies gilt insbesondere auch für das Ovarialkarzinom, bei dem in über 20 % der Fälle Veränderungen von copy number variations auf Chromosom 19 auftreten (Mitelman et al. 2008). So konnten Verluste auf 19q13.3/4 mit einem längeren Krankheitsfreien Überleben in Zusammenhang gebracht werden, da es den KLK Locus (Kallikrein, eine Proteingruppe der Serinproteasen) enthält (Bayani et al. 2011). In unseren Analysen konnten wir zeigen, dass Verluste von 19q13.33 (chr19\_50335249-50398880) mit einem signifikant besseren Überleben

gegenüber der Gruppe ohne Verluste korrelierten, die Differenzierung erfolgte im Log Rank Test mit einem  $p\text{-Wert}=0,01149$ , siehe Abbildung 10.

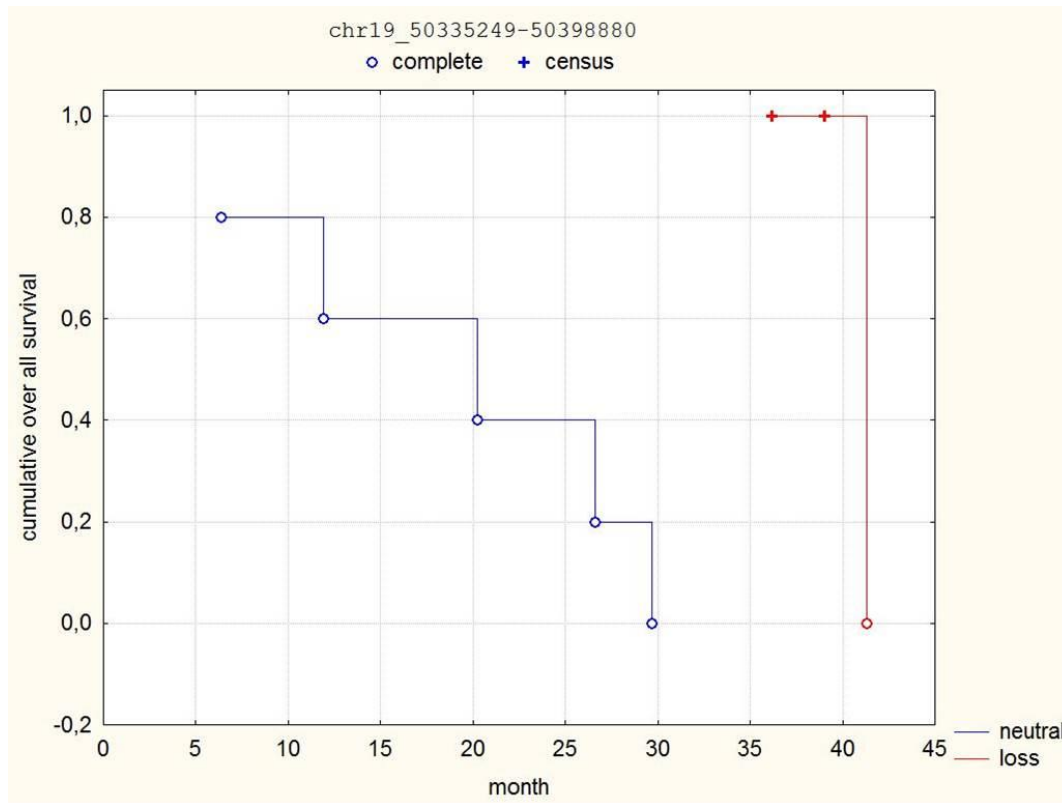


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve für Patientinnen mit Verlusten (rot) und ohne Veränderungen (blau) der Gendosis im Bereich von 19q13.33. (Rohwer et al. 2016).

In der TCGA Datenbank (The Cancer Genome Atlas) konnte nachvollzogen werden, dass diese Region viele Gene enthält, zum Beispiel PNKP (polynucleoide kinase 3'-phosphatase), ein Gen welches an DNA Reparatur Prozessen beteiligt ist sowie AKT1S1, ein Gen welches Einflüsse auf das Zellwachstum ausübt. Es ist bekannt, dass ein Verlust dieser Gene drastische Konsequenzen auf die Überlebensregulation im Zellzyklus ausüben kann.

Insgesamt wurden die Ergebnisse aus den SKY-Analysen nur zum Teil von der arrayCGH bestätigt und diese stellt ein bei besserer genetischer Auflösung, kostengünstigeres und effektiveres Verfahren dar als die SKY-Technik. Obwohl auch sie gewissen methodischen Einschränkungen unterliegt, stellt sie im Vergleich das zuverlässigere Verfahren für die genetische Analyse heterogener Tumorzellen dar.

## 5.4. Ausblick

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs mit der arrayCGH an dem in dieser Arbeit analysierten Patientenkollektiv werden durch das Onkologische Labor für Anträge auf weiterführende Studien mit größerer Kohorte genutzt. Im Rahmen von Untersuchungen mittels arrayCGH können dann insbesondere diejenigen primären Tumorzellen von Patientinnen dem Kollektiv wieder zugeführt werden, welche aufgrund von schlechter Metaphasequalität frühzeitig aus dem Patientenkollektiv für die SKY-Analysen ausgeschlossen wurden.

Eine Herausforderung bei der Analyse größerer Patientenkollektive stellt sicherlich die Auswertung der erhobenen Daten dar. Eine Analyse mittels Verfahren wie der arrayCGH, die den Durchsatz großer Patientenkollektive mit hoher genetischer Auflösung effektiv und kostengünstig ermöglichen, erfordert weitere Anstrengungen zur Verarbeitung dieser großen Datenmengen in Kombination mit Auswertungen der Gendatenbanken, wofür sicherlich das computergestützte maschinelle Lernen umfangreiche Unterstützung bieten wird. Die Entwicklungen im Bereich der künstlichen Generierung von Erfahrung durch Computer, welche erst durch eine enorme Steigerung der Rechnerleistungsfähigkeit möglich wurde, wird zukünftig die Auswertung der bereits vorhandenen und wachsenden Datenmengen ermöglichen. Nichtsdestotrotz bieten diese Techniken zwar für die Auswertung der bereits erhobenen SKY-Daten Unterstützung, sie können jedoch nicht die Notwendigkeit größerer Kohorten beschränken und die methodischen Schwierigkeiten der FISH-Verfahren bleiben hierdurch unbeeinflusst.

Anwendungsmöglichkeiten und Einschränkungen zur Vorhersagewahrscheinlichkeit verschiedener Systeme des maschinellen Lernens zur Prädiktion des Outcomes von Mammakarzinom-Patientinnen zeigte hierzu eine Forschergruppe in einer systematischen Zusammenfassung (Montazeri et al. 2016). Perspektiven in gleicher Richtung wurden in einem Review bezogen auf das Rezidivrisiko von Ovarialkarzinomen dargelegt (Vidyasagar 2014). Insbesondere die sogenannten *targeted therapies* oder individualisierten Krebstherapien könnten durch Vergleiche des Genoms der zu behandelnden Patientin mit Outcome-Vergleichsdaten aus Datenbanken perspektivisch umfangreiche Möglichkeiten aufzeigen, den betroffenen



Patientinnen computerbasiert, genetisch zugeschnittene Therapien anbieten zu können und eine Vorhersage zum Therapieansprechen zu geben.

Insgesamt sind die aktuellen Entwicklungen im Bereich der Erforschung genbasierter Informationen zur Optimierung von Krebstherapien rasant und es ist zu erwarten, dass auch für das bisher vergleichsweise schlecht therapierbare Ovarialkarzinom Verbesserungen für die betroffenen Patientinnen erreicht werden können.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Zellkulturen aus OP Präparaten von 9 Patientinnen mit einem in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostizierten Ovarialkarzinom auf das Vorhandensein von sich wiederholenden genetischen Aberrationen, sogenannten Markerchromosomen, untersucht. Hierfür wurde die Spektrale Karyotypisierung (SKY) genutzt, ein Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), welches die gesamten Chromosomen (whole chromosome painting) differenziert mittels Fluorophoren sichtbar macht.

Die Ovarialkarzinomzellen aus primären OP-Resektaten wurden hierfür durch das onkologische Labor der Frauenklinik in Kultur genommen und in der Metaphase arretiert, in mehreren Waschschritten vorbereitet, dann mit den Fluorophoren hybridisiert und anschließend mit einem speziell aufgerüsteten Mikroskop für eine computergestützte Auswertung aufgenommen. In der Auswertung von 90 Metaphasen wurden sich wiederholende Aberrationen statistisch erfasst und auf ihre Häufigkeit und Verteilung im Patientenkollektiv hin untersucht.

Anschließend konnte für einen Teil der identifizierten Veränderungen eine Korrelation zum Ansprechen der Patientinnen auf eine adjuvante platinbasierte Chemotherapie hergestellt werden. Hierzu wurde das Patientenkollektiv in eine Gruppe von platin sensitiveren und weniger gut ansprechenden Patientinnen unterteilt. Das Ansprechen des Tumors auf die platinbasierte Therapie wurde unterteilt nach dem Tumorfreen Intervall und somit der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs nach Beendigung der Therapie. Insgesamt konnten mehrere wiederholt auftretende Aberrationen deskriptiv in Zusammenhang mit der Platinsensibilität gestellt werden. Allerdings war das Patientenkollektiv für eine umfassendere statistische Analyse zu klein und eine weitere Vergrößerung des Patientenkollektivs war durch methodische Einschränkungen wie eine mangelnde Metaphasequalität bei hoher Heterogenität der dargestellten Tumorzellen limitiert. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass ein Unterschied in der Verteilung der chromosomalen Aberrationen zwischen den beiden Gruppen bestand.

Die Nullhypothese, dass kein Unterschied bezüglich der chromosomalen Aberrationen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie bestand, konnte somit bedingt abgelehnt werden. Die hierzu notwendigen höherwertigen statistischen

Tests konnten bei zu kleiner Stichprobe nicht durchgeführt werden. Die Alternativhypothese, welche sich als Fragestellung konkret auf die signifikante Zuordnung eines möglichen Markerchromosoms zu einer der beiden Gruppen bezog, konnte ferner anhand der Ergebnisse aus der SKY-Analyse nicht untersucht werden.

Durch das Onkologische Labor der Frauenklinik wurde dasselbe Patientenkollektiv nochmals mittels einer array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (aCGH) im Rahmen eines Methodenvergleichs untersucht und die Ergebnisse deckten sich nur zum Teil. Insgesamt zeigte sich, dass die arrayCGH das geeigneter Verfahren insbesondere hinsichtlich Effizienz und Kosten darstellt. Auch das Patientenkollektiv könnte hiermit deutlich vergrößert werden, was die statistische Auswertbarkeit erheblich erhöhen würde.

Somit wurden unsere Ergebnisse als proof of principle eingesetzt und weiterführende Untersuchungen an einem wesentlich größeren Kollektiv befinden sich in der Planung, um zukünftig den betroffenen Patientinnen bessere Aussagen bezüglich der Effektivität einer Chemotherapie bieten zu können (Rohwer et al. 2018). Die SKY-Analyse ist hierzu allerdings nicht mehr die Methode der Wahl und findet nur für spezielle Fragestellungen wie zum Beispiel die Suche nach Translokationen ihre Anwendung.

## 7. Literaturverzeichnis

Aabo, K.; Adams, M.; Adnitt, P.; Alberts, D. S.; Athanazziou, A.; Barley, V. et al. (1998): Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists' Group. In: *British journal of cancer* 78 (11), S. 1479–1487.

Ayhan, A.; Celik, H.; Taskiran, C.; Bozdog, G.; Aksu, T. (2003): Oncologic and reproductive outcome after fertility-saving surgery in ovarian cancer. In: *European journal of gynaecological oncology* 24 (3-4), S. 223–232.

Bankhead, Clare R.; Kehoe, Sean T.; Austoker, Joan (2005): Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 112 (7), S. 857–865. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x.

Barallon, Rita; Bauer, Steven R.; Butler, John; Capes-Davis, Amanda; Dirks, Wilhelm G.; Elmore, Eugene et al. (2010): Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 46 (9), S. 727–732. DOI: 10.1007/s11626-010-9333-z.

Barbarotto, Elisa; Schmittgen, Thomas D.; Calin, George A. (2008): MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. In: *International journal of cancer* 122 (5), S. 969–977. DOI: 10.1002/ijc.23343.

Barcia, Juan Jose (2007): The Giemsa stain: its history and applications. In: *International journal of surgical pathology* 15 (3), S. 292–296. DOI: 10.1177/1066896907302239.

Bayani, Jane; Marrano, Paula; Graham, Cassandra; Zheng, Yingye; Li, Lin; Katsaros, Dionyssios et al. (2011): Genomic instability and copy-number heterogeneity of chromosome 19q, including the kallikrein locus, in ovarian carcinomas. In: *Molecular oncology* 5 (1), S. 48–60. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.08.002.

Beral, V.; Doll, R.; Hermon, C.; Peto, R.; Reeves, G. (2008): Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. In: *Lancet (London, England)* 371 (9609), S. 303–314. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60167-1.

Burger, Robert A.; Brady, Mark F.; Bookman, Michael A.; Fleming, Gini F.; Monk, Bradley J.; Huang, Helen et al. (2011): Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. In: *The New England journal of medicine* 365 (26), S. 2473–2483. DOI: 10.1056/NEJMoa1104390.

Buys, Sandra S.; Partridge, Edward; Black, Amanda; Johnson, Christine C.; Lamerato, Lois; Isaacs, Claudine et al. (2011): Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. In: *JAMA* 305 (22), S. 2295–2303. DOI: 10.1001/jama.2011.766.

Carlson, Joseph W.; Miron, Alexander; Jarboe, Elke A.; Parast, Mana M.; Hirsch, Michelle S.; Lee, Yonghee et al. (2008): Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (25), S. 4160–4165. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.4814.

Chen, Yu-Li; Chang, Ming-Cheng; Huang, Chia-Yen; Chiang, Ying-Cheng; Lin, Han-Wei; Chen, Chi-An et al. (2012): Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival and cytotoxic chemo-response. In: *Molecular oncology* 6 (3), S. 360–369. DOI: 10.1016/j.molonc.2011.11.010.

Chia, N. L. (2009): A comprehensive set of idiograms representing all interpretive levels of resolution: ISCN (2009). In: *Cytogenetic and genome research* 125 (2), S. 162–164. DOI: 10.1159/000227842.

Di Corato, Riccardo; Bigall, Nadja C.; Ragusa, Andrea; Dorfs, Dirk; Genovese, Alessandro; Marotta, Roberto et al. (2011): Multifunctional nanobeads based on quantum dots and magnetic nanoparticles: synthesis and cancer cell targeting and sorting. In: *ACS nano* 5 (2), S. 1109–1121. DOI: 10.1021/nn102761t.

Du Bois, Andreas; Reuss, Alexander; Pujade-Lauraine, Eric; Harter, Philipp; Ray-Coquard, Isabelle; Pfisterer, Jacobus (2009): Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). In: *Cancer* 115 (6), S. 1234–1244. DOI: 10.1002/cncr.24149.

Du Manoir, S.; Schrock, E.; Bentz, M.; Speicher, M. R.; Joos, S.; Ried, T. et al. (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. In: *Cytometry* 19 (1), S. 27–41. DOI: 10.1002/cyto.990190105.

Frigerio, Barbara; Bizzoni, Claudia; Jansen, Gerrit; Leamon, Christopher P.; Peters, Godefridus J.; Low, Philip S. et al. (2019): Folate receptors and transporters: biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38 (1), S. 125. DOI: 10.1186/s13046-019-1123-1.

Gemer, O.; Gdalevich, M.; Ravid, M.; Piura, B.; Rabinovich, A.; Gasper, T. et al. (2009): A multicenter validation of computerized tomography models as predictors of non-optimal primary cytoreduction of advanced epithelial ovarian cancer. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 35 (10), S. 1109–1112. DOI: 10.1016/j.ejso.2009.03.002.

Glasgow, Michelle A.; Yu, Herbert; Rutherford, Thomas J.; Azodi, Masoud; Silasi, Dan-Arin; Santin, Alessandro D.; Schwartz, Peter E. (2013): Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is an effective way of managing elderly women with advanced

- stage ovarian cancer (FIGO Stage IIIC and IV). In: *Journal of surgical oncology* 107 (2), S. 195–200. DOI: 10.1002/jso.23171.
- Grimwood, Jane; Gordon, Laurie A.; Olsen, Anne; Terry, Astrid; Schmutz, Jeremy; Lamerdin, Jane et al. (2004): The DNA sequence and biology of human chromosome 19. In: *Nature* 428 (6982), S. 529–535. DOI: 10.1038/nature02399.
- Guan, Lu-Yao; Lu, Yuan (2018): New developments in molecular targeted therapy of ovarian cancer. In: *Discovery medicine* 26 (144), S. 219–229.
- Haddad, B. R.; Schrock, E.; Meck, J.; Cowan, J.; Young, H.; Ferguson-Smith, M. A. et al. (1998): Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. In: *Human genetics* 103 (5), S. 619–625.
- Hommelshheim, Carl Maximilian; Frantzeskakis, Lamprinos; Huang, Mengmeng; Ulker, Bekir (2014): PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications. In: *Scientific reports* 4, S. 5052. DOI: 10.1038/srep05052.
- Howe, Bradley; Umrigar, Ayesha; Tsien, Fern (2014): Chromosome preparation from cultured cells. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (83), S. e50203. DOI: 10.3791/50203.
- Huang, Xiufeng; Weimer, Jörg; Wurmb-Schwark, Nicole von; Fredrik, Regina; Arnold, Norbert; Schem, Christian (2016): Alteration of STR profiles in ovarian carcinoma cells during primary culture. In: *Arch Gynecol Obstet*. DOI: 10.1007/s00404-016-4018-9.
- Iavazzo, Christos; Gkegkes, Ioannis D.; Vrachnis, Nikolaos (2016): Primary peritoneal cancer in BRCA carriers after prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy. In: *Journal of the Turkish German Gynecological Association* 17 (2), S. 73–76. DOI: 10.5152/jtgga.2016.15223.
- Ibraimov, A. I. (1983): Chromosome preparations of human whole blood lymphocytes: an improved technique. In: *Clinical Genetics* 24 (4), S. 240–242. DOI: 10.1111/j.1399-0004.1983.tb00077.x.
- Imataka, George (2012): Chromosome analysis using spectral karyotyping (SKY). In: *Cell biochemistry and biophysics* 62 (1), S. 13–17. DOI: 10.1007/s12013-011-9285-2.
- Jalal, S. M.; Law, M. E.; Lindor, N. M.; Thompson, K. J.; Sekhon, G. S. (2001): Application of multicolor fluorescent in situ hybridization for enhanced characterization of chromosomal abnormalities in congenital disorders. In: *Mayo Clinic proceedings* 76 (1), S. 16–21. DOI: 10.4065/76.1.16.
- Kallioniemi, O. P.; Kallioniemi, A.; Piper, J.; Isola, J.; Waldman, F. M.; Gray, J. W.; Pinkel, D. (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. In: *Genes, chromosomes & cancer* 10 (4), S. 231–243.
- Kobel, Martin; Rahimi, Kurosh; Rambau, Peter F.; Naugler, Christopher; Le Page, Cecile; Meunier, Liliane et al. (2016): An Immunohistochemical Algorithm for Ovarian

Carcinoma Typing. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 35 (5), S. 430–441. DOI: 10.1097/PGP.0000000000000274.

Lawrie, Theresa A.; Winter-Roach, Brett A.; Heus, Pauline; Kitchener, Henry C. (2015): Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (12), S. CD004706. DOI: 10.1002/14651858.CD004706.pub5.

Leamon, C. P.; Low, P. S. (1991): Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (13), S. 5572–5576.

Leamon, Christopher P.; Reddy, Joseph A.; Vlahov, Iontcho R.; Westrick, Elaine; Parker, Nikki; Nicoson, Jeffrey S.; Vetzal, Marilyn (2007): Comparative preclinical activity of the folate-targeted Vinca alkaloid conjugates EC140 and EC145. In: *International journal of cancer* 121 (7), S. 1585–1592. DOI: 10.1002/ijc.22853.

Ledermann, Jonathan A.; Harter, Philipp; Gourley, Charlie; Friedlander, Michael; Vergote, Ignace; Rustin, Gordon et al. (2016): Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. In: *The Lancet. Oncology* 17 (11), S. 1579–1589. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30376-X.

Lee, C.; Gisselsson, D.; Jin, C.; Nordgren, A.; Ferguson, D. O.; Blennow, E. et al. (2001): Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. In: *American journal of human genetics* 68 (4), S. 1043–1047. DOI: 10.1086/319503.

Leitlinienprogramm Onkologie (2017): S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren. AWMF-Registernummer: 032/035OL Version 2.1- November 2017. Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>.

Leitlinienprogramm Onkologie (2018): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, . Version 4.1, 2018 AWMF Registernummer: 032-045OL. Online verfügbar unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 04.01.2020).

Leitlinienprogramm Onkologie (2019): S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren. AWMF-Registernummer: 032/035OL Version 3.0.-Januar 2019. Online verfügbar unter [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-035OLI\\_S3\\_Maligne-Ovarialtumoren\\_Diagnostik-Therapie-Nachsorge\\_2019-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035OLI_S3_Maligne-Ovarialtumoren_Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2019-03.pdf), zuletzt geprüft am 27.03.2019.

Leone, Paola E.; Gonzalez, M. Belen; Elosua, Carolina; Gomez-Moreta, Juan A.; Lumbreras, Eva; Robledo, Cristina et al. (2012): Integration of global spectral karyotyping, CGH arrays, and expression arrays reveals important genes in the pathogenesis of glioblastoma multiforme. In: *Annals of surgical oncology* 19 (7), S. 2367–2379. DOI: 10.1245/s10434-011-2202-5.

Lu, Y. J.; Morris, J. S.; Edwards, P. A.; Shipley, J. (2000): Evaluation of 24-color multicolor-fluorescence in-situ hybridization (M-FISH) karyotyping by comparison with reverse chromosome painting of the human breast cancer cell line T-47D. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 8 (2), S. 127–132.

Markman, Maurice; Webster, Kenneth; Zanotti, Kristine; Peterson, Gertrude; Kulp, Barbara; Belinson, Jerome (2004): Survival following the documentation of platinum and taxane resistance in ovarian cancer: a single institution experience involving multiple phase 2 clinical trials. In: *Gynecologic oncology* 93 (3), S. 699–701. DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.03.023.

Micci, Francesca; Skotheim, Rolf I.; Haugom, Lisbeth; Weimer, Jorg; Eibak, Anne Mette E.; Abeler, Vera M. et al. (2010): Array-CGH analysis of microdissected chromosome 19 markers in ovarian carcinoma identifies candidate target genes. In: *Genes, chromosomes & cancer* 49 (11), S. 1046–1053. DOI: 10.1002/gcc.20813.

Mirza, Mansoor R.; Monk, Bradley J.; Herrstedt, Jorn; Oza, Amit M.; Mahner, Sven; Redondo, Andres et al. (2016): Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. In: *The New England journal of medicine* 375 (22), S. 2154–2164. DOI: 10.1056/NEJMoa1611310.

Mitelman et al. (2008): "Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2016). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>". Unter Mitarbeit von Mertens F. Johansson B.

Montazeri, Mitra; Montazeri, Mohadeseh; Montazeri, Mahdiah; Beigzadeh, Amin (2016): Machine learning models in breast cancer survival prediction. In: *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine* 24 (1), S. 31–42. DOI: 10.3233/THC-151071.

Morch, Lina Steinrud; Lokkegaard, Ellen; Andreassen, Anne Helms; Kruger-Kjaer, Susanne; Lidegaard, Oyvind (2009): Hormone therapy and ovarian cancer. In: *JAMA* 302 (3), S. 298–305. DOI: 10.1001/jama.2009.1052.

Morris, R. T.; Joyrich, R. N.; Naumann, R. W.; Shah, N. P.; Maurer, A. H.; Strauss, H. W. et al. (2014): Phase II study of treatment of advanced ovarian cancer with folate-receptor-targeted therapeutic (vintafolide) and companion SPECT-based imaging agent (99mTc-etarfolatide). In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 (4), S. 852–858. DOI: 10.1093/annonc/mdu024.

Mutch, David G.; Prat, Jaime (2014): 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. In: *Gynecologic oncology* 133 (3), S. 401–404. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.04.013.

Parker, Nikki; Turk, Mary Jo; Westrick, Elaine; Lewis, Jeffrey D.; Low, Philip S.; Leamon, Christopher P. (2005): Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. In: *Analytical biochemistry* 338 (2), S. 284–293. DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.026.



Pearce, Celeste Leigh; Templeman, Claire; Rossing, Mary Anne; Lee, Alice; Near, Aimee M.; Webb, Penelope M. et al. (2012): Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. In: *The Lancet. Oncology* 13 (4), S. 385–394. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70404-1.

Pearson, K. (1992): On the Criterion that a Given System of Deviations from the Probable in the Case of a Correlated System of Variables is Such that it Can be Reasonably Supposed to have Arisen from Random Sampling. In: *Kotz S., Johnson N.L. (eds) Breakthroughs in Statistics, Springer Series in Statistics (Perspectives in Statistics). Springer, New York, NY.*

Prager, Gerald W.; Lackner, Eva-Maria; Krauth, Maria-Theresa; Unseld, Matthias; Poettler, Marina; Laffer, Sylvia et al. (2010): Targeting of VEGF-dependent transendothelial migration of cancer cells by bevacizumab. In: *Molecular oncology* 4 (2), S. 150–160. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.01.002.

Raniolo, Sofia; Vindigni, Giulia; Ottaviani, Alessio; Unida, Valeria; Iacovelli, Federico; Manetto, Antonio et al. (2018): Selective targeting and degradation of doxorubicin-loaded folate-functionalized DNA nanocages. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 14 (4), S. 1181–1190. DOI: 10.1016/j.nano.2018.02.002.

RKI (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016.

Rohwer, F.; Hedemann, N.; Stope, MB., Mustea, A.; Hilpert, F.; Bauerschlag, DO.; Maass, N. (2018): Evidence for Predictive Markers of Platinum Effectiveness in Ovarian Carcinoma by Microarraybased Comparative Genomic Hybridization. In: *Current Opinion in Gynecology and Obstetrics*. Online verfügbar unter <http://www.gratisoa.org/journals/index.php/COGO/article/view/1010>.

Rohwer, F.; Weimer, J.; Hedemann, N.; Bauerschlag, D.; Maass, N.; Arnold, N. (2016): Einige der häufigsten, wiederkehrenden Chromosomenveränderungen in Ovarialkarzinomen könnten die Wirksamkeit von Platintherapien differenzieren. Poster-Nummer: 6.1. 8. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie. Düsseldorf, 10.11.2016.

Schröck, E.; Du Manoir, S.; Veldman, T.; Schoell, B.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M. A. et al. (1996): Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. In: *Science (New York, N.Y.)* 273 (5274), S. 494–497.

Schwartz, P. E.; Rutherford, T. J.; Chambers, J. T.; Kohorn, E. I.; Thiel, R. P. (1999): Neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer: long-term survival. In: *Gynecologic oncology* 72 (1), S. 93–99. DOI: 10.1006/gyno.1998.5236.

Sieh, Weiva; Salvador, Shannon; McGuire, Valerie; Weber, Rachel Palmieri; Terry, Kathryn L.; Rossing, Mary Anne et al. (2013): Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies. In: *International journal of epidemiology* 42 (2), S. 579–589. DOI: 10.1093/ije/dyt042.

Trimbos, Baptist; Timmers, Petra; Pecorelli, Sergio; Coens, Corneel; Ven, Koen; van der Burg, Maria; Casado, Antonio (2010): Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. In: *Journal of the National Cancer Institute* 102 (13), S. 982–987. DOI: 10.1093/jnci/djq149.

Vidyasagar, M. (2014): Machine learning methods in the computational biology of cancer. England.

Weimer, J.; Koehler, M. R.; Wiedemann, U.; Attermeyer, P.; Jacobsen, A.; Karow, D. et al. (2001): Highly comprehensive karyotype analysis by a combination of spectral karyotyping (SKY), microdissection, and reverse painting (SKY-MD). In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 9 (5), S. 395–402.

Zwakman, Nienke; van de Laar, Rafli; van Gorp, Toon; Zusterzeel, Petra L. M.; Snijders, Marc P M L; Ferreira, Isabel et al. (2016): Perioperative changes in serum CA125 levels: a prognostic factor for disease-specific survival in patients with ovarian cancer. In: *Journal of gynecologic oncology*, S. e7. DOI: 10.3802/jgo.2017.28.e7.

## 8. Anhang

### 8.1.FIGO Klassifikation

FIGO Stadium	TNM	Definition
	TX	Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
	TO	Kein Anhalt für einen Tumor
I	T1	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
IA	T1a	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
IB	T1b	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
IC	T1c	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
IC1	T1c1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
IC2	T1c2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
IC3	T1c3	maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
II	T2	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
IIA	T2a	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
IIB	T2b	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
III	T3 und/oder N1	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
	T3	Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIA1i	N1a	Metastasen ≤ 10 mm
IIIAii	N1b	Metastasen > 10 mm
IIIA2	T3a jedes N	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
IIIB	T3b jedes N	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen

IIIC	T3c jedes N	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
IV	M1	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
IVA	M1a	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
IVB	M1b	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

***Tabelle 7:** Beschreibung der FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms mit entsprechender TNM-Klassifikation (Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Entsprechend der englischen Originalfassung aus Clinical Commentary 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer (Mutch und Prat 2014).*

<b>FIGO</b>	<b>TNM</b>	<b>Ursprung</b>
OV	Tov	Ovar
FT	Tft	Tube
P	Tp	Peritoneum
X	TX	Unklar

***Tabelle 8:** Ergänzung zu Tabelle 7, die Angabe des Tumorursprungs erfolgt über das jeweilige Suffix (Leitlinienprogramm Onkologie 2019).*

## 8.2. ISCN- Nomenklatur

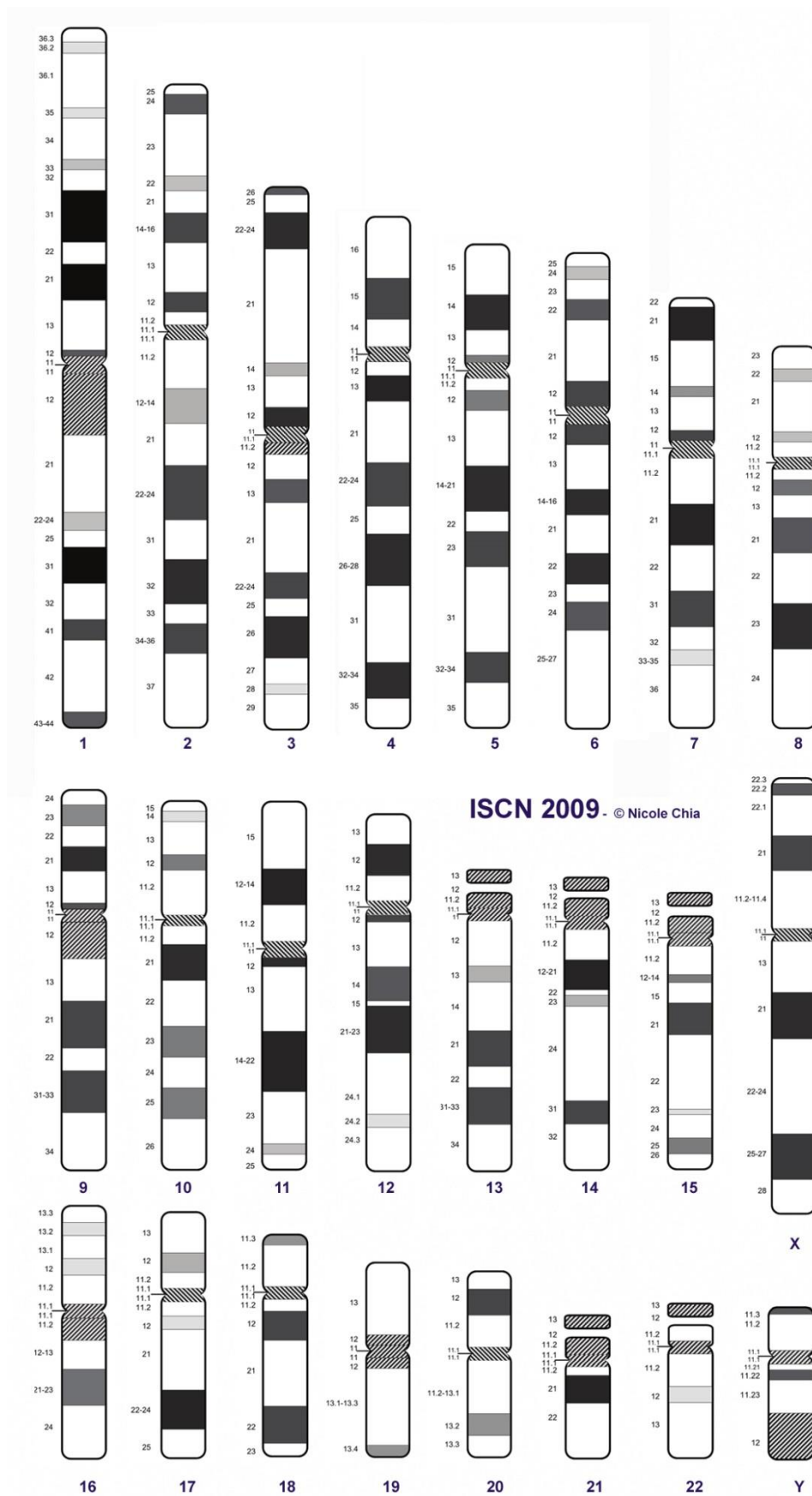


Abbildung 11: Vereinfachte Ideogramme und Nomenklatur eines Karyogramms von konventionell gebänderten mit Giemsa-Trypsin gefärbten Chromosomen (Chia 2009). Der p-Arm befindet sich oberhalb des als Einkerbung dargestellten Zentromers, der q-Arm unterhalb. Große Bänder werden aufsteigend von Zentromer nach Telomer mit 1,2,3 etc. auf dem jeweiligen p- bzw. q-Arm nummeriert. Zum Beispiel entspricht das Band 11q1 dem ersten Band auf dem langen Arm von Chromosom 1 und wird weiter unterteilt in 11q11-11q14 und könnte noch weiter unterteilt werden in 11q14.1. bis 11q14.3. Die zum Zeitpunkt dieser Arbeit gültige Fassung, welche für die Klassifizierung der hier beschriebenen Aberrationen genutzt wurde, ist die Nomenklatur nach ISCN 2016 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016), McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M., erschienen im Karger-Verlag und unter der ISBN 978-3-318-05857-4 erhältlich. Hierin können alle Details insbesondere zur Beschreibung komplexer struktureller Aberrationen und Rearrangements nachvollzogen werden.

### 8.3. Ergebnisse Patientin 2-9

Tabelle 9: Es folgen die Ergebnisse der Patientinnen 2-9. Zugeordnet zu den in der linken Spalte erfassten Derivatvchromosomen (der) mit entsprechender ISCN-Nomenklatur analog zu Abbildung 12 sind in den rechten Spalten die ausgewerteten Metaphasen entsprechend ihrer Originalbezeichnung aus den Case Reports, wie beispielhaft unter 3.5. in Abbildung 3 gezeigt, dargestellt und numerisch nach Anzahl ihres Auftretens erfasst.

<b>Zusammenfassung Patientin 2</b>	Met0 1	Met0 2	Met0 5	Met0 6	Met1 1	Met1 2	Met1 5	Met2 0	Met2 1
<b>der(1)</b>	2	2	0	1	1	0	0	2	1
der(1)t(1;1)(p32;q31)						1			
der(1)del(1)(p32)					2				
der(1)del(1)(p31)				1					1
der(1)del(1)(p31q32)			1						
der(1)del(1)(p22)						1			
der(1)del(1)(p21)					1				
der(1)del(1)(p11q31)	1								
der(1)del(1)(q12)			2						
der(1)del(1)(q32)								1	
<b>der(2)</b>	0	1	0	1	1	2	1	1	0
der(2)del(2)(p21q33)			1						
der(2)del(2)(p21)			1						
der(2)del(2)(p16q11)	1								
der(2)del(2)(p16)				1					
der(2)del(2)(p15q32)		1							
der(2)del(2)(p15)		1							
der(2)del(2)(p14q31)									1
der(2)del(2)(p12q23)						1			
der(2)del(2)(q32)				1			1		
<b>der(3)</b>	2	2	2	2	1	3	4	2	3
der(3)del(3)(p24q11)	1								
der(3)del(3)(p24)	1								

der(3)del(3)(p21q21)					1				1
der(3)del(3)(p21)					1				
der(3)del(3)(p11)				1					
der(3)del(3)(q24)							1		
<b>der(4)</b>	2	0	2	2	1	2	1	3	0
der(4)del(4)(p14q31)						1			
der(4)del(4)(p11q25)									1
der(4)del(4)(q13)					1				
der(4)del(4)(q24)						1	1		
der(4)del(4)(q25)									3
<b>der(5)</b>	2	0	2	1	1	0	1	3	0
der(5)del(5)(p15q22)							1		
der(5)del(5)(p14q31)	1								
der(5)del(5)(p13q14)				1					
der(5)del(5)(p13)				1					
der(5)t(4;5)(p12;p13)						1			
der(5)del(5)(q11)									1
der(5)del(5)(q12)		1		1					
der(5)del(5)(q14)					1				
der(5)del(5)(q21)						1			
der(5)del(5)(q23)			1						
der(5)del(5)(q31)			1						
<b>der(6)</b>	1	0	1	2	3	3	1	2	0
der(6)del(6)(p22q24)		1							
der(6)del(6)(p22q14)					1				
der(6)del(6)(p21q21)						1			
der(6)del(6)(p21)			1	1					
der(6)del(6)(p21)									2
der(6)del(6)(p12)							1		
der(6)del(6)(p11)	2								
der(6)del(6)(q12)					1				
der(6)del(6)(q24)		2							
<b>der(7)</b>	0	1	0	1	0	1	0	0	1
der(7)t(7;13)(p15;q21)								1	
der(7)del(7)(p15q11)	1								
der(7)del(7)(p14q32)		1							
der(7)del(7)(p14q22)		1							
der(7)del(7)(p13)							1		
der(7)del(7)(p12)								1	
der(7)del(7)(p11)						2			
der(7)del(7)(p11q31)	1								
der(7)del(7)(q11)			2	3	2				1
der(7)del(7)(q14)									1
<b>der(8)</b>	1	2	2	2	2	2	1	2	1
der(8)del(8)(p21q24)							1		
der(8)del(8)(p12q21)					1				
der(8)del(8)(p12)		1							
der(8)del(8)(q13)									1

der(8)del(8)(q22)				1					
<b>der(9)</b>	1	2	2	2	0	1	1	1	2
der(9)del(9)(p21q22)							2		
der(9)del(9)(p12)					1				
der(9)del(9)(q12)			1						
<b>der(10)</b>	2	1	2	1	1	2	1	4	0
der(10)ins(3;10)(p21p26;p12)									1
der(10)t(10;19)(p13;q12)			1						
der(10)del(10)(p12q22)					1				
der(10)del(10)(q22)							2		1
der(10)t(10;X)(q22;q21)									1
der(10)del(10)(q23)				1					
<b>der(11)</b>	2	0	2	0	0	1	3	0	1
der(11)ins(11)(p15q13)					1				
der(11)del(11)(p14q22)				1					
der(11)del(11)(p12q23)								2	
der(11)t(5;11)(q11;p13)				1					
der(11)t(11;14)(p11;q21)							1		
der(11)t(11;15)(p11;q25)del(11)(q22)				1					
der(11)del(11)(p11)									1
der(11)del(11)(q12)		1							
der(11)dup(11)(q13q25)						1			
der(11)del(11)(q14)					2				
<b>der(12)</b>	1	2	0	1	4	2	1	1	1
der(12)del(12)(p12q15)	1								
der(12)del(12)(p12q21)		1							
der(12)del(12)(p12)			2						
der(12)del(12)(p11)								1	1
der(12)t(12;16)(p11;p11)									1
der(12)del(12)(p11q23)		2							
der(12)t(1;12)(q12;q14)							1		
der(12)i(12)(q)	1								
der(12)del(12)(q13)	1								
der(12)del(12)(q14)				1					
der(12)del(12)(q21)				3					
der(12)ins(12;22)(q21;q11qter)		1							
der(12)t(9;12)(p11;q22)								1	
<b>der(13)</b>	2	0	4	2	0	2	2	3	5
der(13)i(13)(q)		1			1				
der(13)del(13)(q21)					1				
<b>der(14)</b>	1	0	0	1	0	0	1	2	0
der(14)t(14;14)(p11;q21)									
der(14)i(14)(q)del(14)(q22)	1								
der(14)t(14;14)(p11;q21)							1		
<b>der(15)</b>	1	4	2	3	1	1	1	0	2



der(15)t(15;15)(p11;q11q22)				1					
der(15)del(15)(q22)		1			1				
der(15)i(q22)				1					
<b>der(16)</b>	1	1	2	0	3	3	1	1	1
der(16)del(16)(p12)								1	1
der(16)del(16)(p11)	1		2						
der(16)t(16,16)(p11,q11)	1								
der(16)del(16)(q11)	1								
<b>der(17)</b>	1	0	0	0	0	2	1	2	1
der(17)del(17)(p11)	1								
<b>der(18)</b>	1	1	0	3	2	4	1	2	0
<b>der(19)</b>	3	2	2	1	1	1	1	2	1
<b>der(20)</b>	0	0	2	0	2	2	0	2	2
<b>der(21)</b>	2	1	0	4	0	2	0	1	0
<b>der(22)</b>	2	0	2	0	0	2	1	0	0
der(22)i(22)(q)		1							
der(22)dup(22)(q11qter)									1
<b>der(X)</b>	0	0	2	0	1	0	0	1	1
der(X)del(X)(p11)	1								
der(X)del(X)(q13)	1								
der(X)del(X)(q21)		1							
der(X)del(X)(q22)							1		
der(X)del(X)(q23)				1					

<b>Zusammenfassung Patientin 3</b>	Met01	Met02	Met03	Met08	Met09	Met14	Met18
<b>der(1)</b>	1	2	1	1	0	1	0
der(1)t(1;7)(p35;q32)	1						
der(1)t(1;6;13)(p32q25;p12;q21)					1		
der(1)del(1)(p32)		2					
der(1)del(1)(p31)	1				1		1
der(1)del(1)(p22q21)		1					
der(1)i(1)(p11)				1			
der(1)t(1;14)(q11;q24)	1						
der(1)del(1)(q12)							1
der(1)del(1)(q21)			1		1		
<b>der(2)</b>	1	2	1	0	1	1	0
der(2)del(2)(p22)					2		
der(2)del(2)(p16)						1	
der(2)t(2;10;12)(p11q31;q23;q13)				1			
der(2)del(2)(q13)				4			
der(2)del(2)(q21)							1
der(2)del(2)(q31)			1				
der(2)t(2;X)(q31;p11.4)del(2)(p21)	1						
<b>der(3)</b>	1	2	0	2	1	4	1

der(3)del(3)(q26.3)			2				
der(3)t(3;10)(p26;q22)				1			
der(3)t(3;11)(p21;q12q22)					1		
der(3)del(3)(p12)	1						
der(3)del(3)(p11q26)						1	
der(3)del(3)(q11)			1	2			1
der(3)t(3;5)(q11;q11)				1			
der(3)dic(3;3)(q29;q29)					1		
<b>der(4)</b>	0	1	1	1	2	2	1
der(4)t(3;4)(p21q21)				1			
der(4)dup(4)(p15q31)				1			
der(4)t(4;17)(p15;q12)					2		
der(4)del(4)(p11q28)			1			1	
der(4)del(4)(q13)						1	
der(4)del(4)(q24)	1						
der(4)del(4)(q31)		1					2
<b>der(5)</b>	2	1	2	3	2	2	2
der(5)del(5)(p11)		1					
der(5)del(5)(q11)		1		2			
der(5)del(5)(q14)						1	
<b>der(6)</b>	2	1	2	1	0	0	1
der(6)del(6)(p12)				1			
der(6)del(6)(p11q22)		1					
der(6)i(6)(q)						1	
der(6)del(6)(q11)			2				
der(6)del(6)(q12)				1			
der(6)del(6)(q16)			1				
der(6)t(6;15)(q16;q14)					1		
der(6)del(6)(q21)						1	
<b>der(7)</b>	0	0	1	1	1	0	1
der(7)del(7)(p21q31)						1	
der(7)del(7)(p21)							1
der(7)t(7;X)(p11;q12)del(7)(q31)							1
der(7)del(7)(p11q31)		1					
der(7)del(7)(q11)			1	1		2	
der(7)del(7)(q21)					1		1
der(7)del(7)(q31)				1			
der(7)del(7)(q32)	1						
<b>der(8)</b>	2	1	2	1	0	2	0
der(8)del(8)(p21)					1		
der(8)del(8)(p11.2)				1			
der(8)del(8)(p11)						1	
der(8)del(8)(q11)					1		
der(8)del(8)(q12)							2
<b>der(9)</b>	1	2	0	3	1	1	1
der(9)dup(9)(q34p12)				1			
der(9)del(9)(q34)	1						
<b>der(10)</b>	2	2	2	3	1	0	1
der(10)dup(10)(p15p13)				1			
der(10)del(10)(p12)				1			
der(10)del(10)(q22)			1			2	
der(10)t(6;10)(q15;q22)del(6)(q24)		1					
<b>der(11)</b>	2	1	3	1	1	3	3
der(11)del(11)(p14)				1			

der(11)del(11)(p14q22)				1			
der(11)del(11)(p14q12)				1			
der(11)del(11)(p11)	1						
der(11)dup(11)(q13q23)		1					
der(11)dup(11)(q14q25)					1		
der(11)del(11)(q21)		1					
der(11)t(11;13)(q23;q12)					1		
<b>der(12)</b>	1	0	2	2	4	1	3
der(12)t(12;15)(p13;q11)					1		
der(12)del(12)(p11q22)		2					
der(12)inv(12)(p11q24)					2		
der(12)del(12)(q22)			1			2	
der(12)del(12)(q23)						1	
<b>der(13)</b>	2	2	1	1	1	1	3
der(13)t(3;13)(p21;q34)						1	
der(13)i(13)(q10)				2			
der(13)dup(13)(q11qter)					1		
<b>der(14)</b>	2	1	2	1	0	0	1
der(14)del(14)(q21)		1					
der(14)del(14)(q22)				1		2	
der(14)del(14)(q24.3)				1			
der(14)del(14)(q31)	2						
<b>der(15)</b>	1	1	2	2	1	2	2
der(15)del(15)(q21)				1			
der(15)del(15)(q22)					1		
<b>der(16)</b>	2	2	2	1	2	3	1
der(16)dic(16)(p13.1p13.1)				1			
der(16)t(16;21)(p11.2;q22.1)del(16)(q12.2)				1			
der(16)del(16)(q13)				1			
<b>der(17)</b>	1	2	1	2	0	1	2
der(17)t(7;17)(q31;p11.2)	1						
<b>der(18)</b>	2	2	0	3	1	1	2
der(18)dic(18)(p11.3)			1				
<b>der(19)</b>	3	2	1	1	2	0	2
der(19)del(19)(p11)					2		
der(19)del(19)(q12)				3			
<b>der(20)</b>	2	2	1	1	0	3	2
<b>der(21)</b>	4	2	1	1	0	0	0
der(21)t(21;X)(p12;p11)			1				
der(21)t(16;21)(q21;p10)dup(21)(q11.2)				2			
<b>der(22)</b>	2	1	1	3	1	2	2
der(22)del(22)(q11)		1					
<b>der(X)</b>	4	2	1	1	1	0	0
der(X)t(2;X)(p12;p22.3)				1			
der(X)del(X)(p11)						1	1
der(X)del(X)(q13)					1	2	1
der(X)del(X)(q21)				1			
der(X)del(X)(q22)			1				

<b>Zusammenfassung Patientin 4</b>	Met0 2	Met0 9	Met1 0	Met1 1	Met1 2	Met1 3	Met1 4	Met1 9	Met2 2	Met2 3
<b>der(1)</b>	0	1	1	2	0	1	2	2	1	2
der(1)del(1)(p32)			1							
der(1)del(1)(p31)	1								1	
der(1)del(1)(p31q11)	1									
der(1)t(1;6)(p31;p12)					1					
der(1)del(1)(p21)		3			1					
der(1)del(1)(q11)					1					
der(1)del(1)(q21)							1			
<b>der(2)</b>	1	1	1	1	0	1	2	3	2	2
der(2)del(2)(p21)		1								
der(2)del(2)(p14)		1								
der(2)del(2)(p14q31)					1					
der(2)del(2)(p12)									1	
der(2)del(2)(p11)							1			1
der(2)del(2)(q11)							1			
der(2)del(2)(q24)	1									
<b>der(3)</b>	1	2	1	4	2	0	2	1	2	2
der(3)del(3)(p22q24)	1									
der(3)del(3)(p21)			1	1		2				
der(3)del(3)(p21p12)					1					
der(3)t(3;17)(q22;q21)			1							
<b>der(4)</b>	2	1	0	1	1	1	2	2	2	2
der(4)del(4)(p11q23)			1							
der(4)del(4)(q11)						2				
der(4)del(4)(q13)	1									
der(4)del(4)(q23)			2			2				
der(4)del(4)(q31)						1				
<b>der(5)</b>	1	3	4	0	2	1	1	2	2	1
der(5)t(5;9)(q11;q11)								1		
der(5)del(5)(q23)				2	1					
<b>der(6)</b>	0	1	2	1	0	1	2	2	2	2
der(6)del(6)(p21)							1			
der(6)del(6)(p21q21)				2						
der(6)del(6)(p11)					1					
der(6)del(6)(q11)					1					
der(6)del(6)(q12)						1				
der(6)del(6)(q14)		1		1			1			
der(6)del(6)(q22)	2									
<b>der(7)</b>	0	1	0	1	3	1	0	2	3	1
der(7)del(7)(p15)							1			
der(7)del(7)(p14q31)								1		
der(7)del(7)(p11)							1			
der(7)del(7)(q11)	1							1		1
der(7)del(7)(q22)		1								1

der(8)	0	2	1	2	1	2	1	2	2	1
der(8)del(8)(p11)	1									
der(8)del(8)(q11)			2							
der(8)del(8)(q13)		1			1					
der(8)del(8)(q22)						1				
der(8)ins(8;11)(q23;q12q14)					1					
<b>der(9)</b>	2	2	1	3	4	2	5	4	2	1
der(9)del(9)(p21q22)									1	
der(9)del(9)(p12)										1
der(9)del(9)(p11)	1									
der(9)del(9)(q12)										1
<b>der(10)</b>	0	2	1	1	1	2	1	4	1	3
der(10)dic(10;10)(p15;p15) del(10)(q21)				1						
der(10)del(10)(p12)						1				
der(10)del(10)(p12.1q24)				1						
der(10)del(10)(p12q22)						3				
der(10)del(10)(p11)	2				1					
der(10)del(10)(q21)									1	
der(10)del(10)(q22)		1					1		1	
der(10)del(10)(q23)			1							
<b>der(11)</b>	2	1	1	1	2	1	0	1	3	0
der(11)del(11)(p14q13)									1	
der(11)del(11)(p12)									1	
der(11)del(11)(p11)		1	1	1						
der(11)del(11)(q11)		1								
der(11)del(11)(q13)									2	
der(11)del(11)(q23)							1			
<b>der(12)</b>	1	0	1	0	2	3	2	1	2	1
der(12)del(12)(q14)	1									
<b>der(13)</b>	1	1	1	2	1	2	1	1	2	4
der(13)i(13)(q)del(13)(q21)			1							
der(13)del(13)(q21)								1	1	
<b>der(14)</b>	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
<b>der(15)</b>	0	2	1	3	1	2	1	1	2	2
der(15)t(14;15)(q11;p11)del(15) (q22)							1			
der(15)t(14;15)(q11;p11)								1		
der(15)i(q)del(15)(q22)del(15)(q 22)			1							
der(15)del(15)(q22)						2				
<b>der(16)</b>	1	2	1	0	4	2	2	2	3	1
der(16)t(12;16)(p11;p13)			1							
der(16)t(16;16)(p12;q11)				1						
der(16)del(16)(p11)	1									
der(16)del(16)(p11q12)										1

der(16)del(16)(q11)		1								
der(16)t(4;16)(q31;q13)	1									
der(16)del(16)(q13)					1					
<b>der(17)</b>	2	0	1	1	2	1	2	1	2	1
der(17)i(17)(q)				1						
der(17)del(17)(p11)								1		
<b>der(18)</b>	1	0	2	1	1	1	3	1	1	1
der(18)i(q)										1
der(18)del(18)(q11)										1
<b>der(19)</b>	0	0	2	2	2	1	0	2	2	0
der(19)t(7;19)(q11;p13.3)			1							
der(19)del(19)(p11)										2
der(19)dup(19)(q11q13.4)										1
<b>der(20)</b>	0	0	0	1	2	0	0	0	2	2
der(20)t(15;20)(q15;q21)					1					
<b>der(21)</b>	0	0	0	3	0	1	0	0	1	2
der(21)t(7;21)(p11;p11)						1				
<b>der(22)</b>	0	0	1	0	1	1	0	0	3	2
der(22)t(6;22)(p12;p11)							1			
der(22)dup(22)(q11q13)				1						
<b>der(X)</b>	2	1	1	1	2	1	0	1	1	2
der(X)del(X)(p21q22)							1			
der(X)del(X)(p11)			1	1						
der(X)del(X)(q11)		1		1						
der(X)del(X)(q13)	1									
der(X)del(X)(q22)					1		1			

<b>Zusammenfassung Patientin 5</b>	Met02	Met03	Met4	Met5	Met6	Met7	Met10
<b>der(1)</b>	2	2	2	1	2	2	2
der(1)del(1)(p31)	1	1					
der(1)del(1)(p31q31)	1						
der(1)del(1)(p21)		1					
der(1)t(1;4)(q23;q13)del(1)(p31)		1					
<b>der(2)</b>	1	1	0	1	2	1	0
der(2)del(2)(p21)	1	1			2		
der(2)del(2)(p13)			1				
der(2)del(2)(q21)						1	
der(2)del(2)(q31)							1
<b>der(3)</b>	1	5	2	1	2	2	0
der(3)t(3;10)(p14;q21)		1					
der(3)del(3)(p12)				1			
der(3)t(3;5)(q21;q11)						1	

der(3)del(3)(q21)							1
<b>der(4)</b>	0	2	2	2	2	2	2
der(4)t(4;8)(p14;p12)	1						
<b>der(5)</b>	1	4	1	1	0	1	2
der(5)del(5)(p13q31)		1					
der(5)del(5)(p12q14)	1						
der(5)del(5)(p11)					1		
der(5)dup(5)(p11pter)					1		
der(5)del(5)(q14)			1				
der(5)del(5)(q31)						1	
<b>der(6)</b>	2	3	2	1	2	2	2
der(6)del(6)(p21.1)				1			
<b>der(7)</b>	2	3	2	1	2	0	0
der(7)del(7)(q22)				2		2	
<b>der(8)</b>	2	3	2	2	2	2	3
der(8)del(8)(q11)							1
<b>der(9)</b>	2	3	2	2	2	2	3
der(9)del(9)(p21)			1				
der(9)del(9)(p13q21)		1					
<b>der(10)</b>	1	4	2	2	2	2	3
der(10)t(9;10)(p13;p11)		1					
der(10)del(10)(p11)		1	1				
der(10)dup(10)(q21q26)	1						
der(10)del(10)(q23)		1					
<b>der(11)</b>	2	3	2	1	2	1	2
der(11)del(11)(q12)				1			
der(11)del(11)(q23)						1	
<b>der(12)</b>	1	4	2	1	2	2	2
der(12)t(5;12)(q11p11)	1						
der(12)del(12)(q12)		1					
<b>der(13)</b>	2	1	2	2	2	1	2
der(13)t(5;13)(p13;p11)		1					
der(13)t(13;14)(p11;q11)		1					
der(13)t(3;13)(q21;p11)						1	
der(13)del(13)(q22)						1	
<b>der(14)</b>	1	2	2	2	0	4	4
der(14)del(14)(q22)	1						
<b>der(15)</b>	2	4	2	2	3	2	2
der(15)del(15)(q22)			1				
<b>der(16)</b>	1	5	2	1	2	2	2

der(16)del(16)(p11)	1						
der(16)t(13;16)(p11;q11)		1					
<b>der(17)</b>	1	4	2	1	2	0	2
<b>der(18)</b>	1	2	2	1	2	2	2
<b>der(19)</b>	2	2	3	1	2	2	2
<b>der(20)</b>	1	0	0	0	2	2	2
<b>der(21)</b>	2	3	0	1	1	2	2
der(21)t(11;21)(p11;p11)			1				
<b>der(22)</b>	2	3	2	0	2	2	2
<b>der(X)</b>	2	0	2	0	2	2	2
der(X)del(X)(p21)		1					

<b>Zusammenfassung Patientin 6</b>	Met 03	Met 05	Met 06	Met 14	Met 15	Met 18	Met 19	Met 22	Met 23	Met 24
<b>der(1)</b>	1	0	0	3	0	1	2	0	1	0
der(1)del(1)(p11->qter)	1							3		3
der(1)del(1)(q11)							1			
der(1)del(1)(q12->qter)	1									
der(1)del(1)(pter->q12)						1				
der(1)del(1)(q41)							1			
der(1)del(1)(p12->q24)			1							
der(1)del(1)(p12,q32.2)	1								2	
der(1)del(1)(p13,q21)				1						
der(1)del(1)(p21->q31)			1							
der(1)del(1)(p11q32)										1
der(1)del(1)(p21->q32)		3								
der(1)del(1)(p22)					1					
der(1)del(1)(p22->q24)			1							
der(1)del(1)(p31q32)						1				
der(1)del(1)(p32)				1						
der(1)del(1)(p32q22)					1					
der(1)del(1)(p32q24)					1					
der(1)del(1)(p33q31)						1				
der(1)del(1)(p34)								1		
der(1)del(1)(pter->p21)	1									
der(1)t(1,4)(p11,p13)				1						
<b>der(2)</b>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
der(2)del(2)(p11)								1		
der(2)del(2)(p12->qter)	1									
der(2)del(2)(p13)							1			
der(2)del(2)(p13q12)									1	
der(2)del(2)(p13q21)								1		
der(2)del(2)(p13)t(1,2)(q32,q12)			1							
der(2)del(2)(p13)t(2,10)(q14,q23)			1							



der(2)del(2)(p16->q12)	1									
der(2)del(2)(p22->q12)		1								
der(2)del(2)(p22q32)					1					
der(2)del(2)(p16q24)					3					
der(2)del(2)(p21->q32)		1								
der(2)del(2)(q12)										2
der(2)del(2)(q14)						1				
der(2)del(2)(q32)						1				
der(2)t(2,9)(q12,q24)						1				
<b>der(3)</b>	3	0	1	1	0	0	1	0	0	2
der(3)del(p21q24)									2	
der(3)del(3)(p24->qter)			1							
der(3)del(3)(p24,p14)			1							
der(3)del(3)(pter->q11)		1								
der(3)del(3)(pter->p24::p21->q24)		1								
der(3)del(3)(pter->p24::p21->q26)		1								
der(3)del(3)(p12->qter)	1									
der(3)del(3)(p12q25)								1		
der(3)del(3)(p11)				1						
der(3)del(3)(p11q26)						2				
der(3)del(3)(p14)				1		3				
der(3)del(3)(p14->q22)		1								
der(3)del(3)(p21)								2		
der(3)del(13)(p21q26.1)										1
der(3)del(3)(q11)					1					
der(3)del(3)(p21)										2
der(3)t(3,12)(p14,q21)				1						
der(3)t(3,10)(p22->q26::q23->qter)		1								
der(3)t(3,3)(qter->q12::p12->qter)	1									
der(3)t(2,3)(3p21.3->q11::2q11->qter)	1									
der(3)t(3,22)(q24,q11)del(3)(p14)								1		
der(3)t(3,6)(q23,q16)del(3)(p21)										1
<b>der(4)</b>	1	1	1	3	3	1	2	0	0	2
der(4)del(4)(p11)									1	
der(4)del(4)(p11q26)									1	
der(4)del(4)(p12q24)									1	
der(4)del(4)(p12q26)									1	
der(4)del(4)(p13)				3						
der(4)del(4)(q11)										1
der(4)del(4)(q12)			2					1		
der(4)del(4)(q22)								1		
der(4)del(4)(q27)										1
der(4)del(4)(q26)									1	
der(4)del(4)(q28)			2							
der(4)del(4)(q24)			1						1	
der(4)del(4)(q32)										1
<b>der(5)</b>	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
der(5)del(5)(pter->q12)		1								
der(5)del(5)(pter->q14)		2								
der(5)del(5)(pter->q23.3)		1								

der(5)del(5)(p12)				2		2				
der(5)del(5)(p13)							1			
der(5)del(5)(p12q14)						1				
der(5)del(5)(p15->q14)		2								
der(5)del(5)(q11)			1							
der(5)del(5)(q13)										1
der(5)del(5)(q21)				1						
der(5)del(5)(q31)					1	2			2	
der(5)t(1,5)(p31,q21)			1							
der(5)t(1,5)(p33,p12)del(5)(q14)				1						
der(5)t(5,16)(q21,p12)			1							
<b>der(6)</b>	3	3	2	2	1	2	1	1	1	0
der(6)del(6)(p12)										1
der(6)del(6)(p12q22)										1
der(6)del(6)(p21)							1	1		
der(6)del(6)(p22q22)										1
der(6)del(6)(q16)					1					
der(6)del(6)(q22)						1				
der(6)t(4,6)(p13,p21)			1							
der(6)i(6)(p)			1							
der(6)t(5,6)(p11,q12)			1							
<b>der(7)</b>	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0
der(7)del(7)(pter->q31)		1								
der(7)del(7)(p12->q21)	1									
der(7)del(7)(p12q32)										1
der(7)del(7)(q21)							1			2
der(7)del(7)(q22)			1			1				
der(7)del(7)(q11)			1		2			2		2
der(7)del(7)(q31)								1		
der(7)del(7)(q32)									1	
der(7)t(7,20)(p15,p11)del(7)(q31)			1							
der(7)del(7)(pter->p15::p12->q31)				1						
<b>der(8)</b>	1	2	1	1	1	3	1	0	1	1
der(8)del(8)(pter->q12)	1									
der(8)del(8)(p11)				1					1	1
der(8)del(8)(p12)							1			
der(8)del(8)(q22)								1		1
der(8)del(8)(q23)				1						
der(8)del(8)(q21)			2							
der(8)t(4,8)(p13,p12)del(8)(q22)			1							
der(8)i(8)(p11q22)										1
<b>der(9)</b>	1	1	2	1	2	2	1	1	0	1
der(9)del(9)(p12)					2		1			
der(9)del(9)(p11q21)										2
der(9)del(9)(p12->q12)		1								
der(9)del(9)(p21)					1	1				
der(9)del(9)(p21->q22)		1				2				
der(9)del(9)(q13)									1	
der(9)del(9)(q22)				1					3	

der(9)del(9)(q31)								1		
der(9)t(9,12)(q31,q24)					1				1	
der(9)t(9,22)(q21,q11.2)										
<b>der(10)</b>	1	0	2	0	0	2	1	1	1	0
der(10)del(10)(pter->q22)	1	1								
der(10)del(10)(p11.2)						1				
der(10)del(10)(p11, q21)				1						
der(10)del(10)(p11, q22)				1					1	
der(10)del(10)(p13q22)					2					
der(10)del(10)(p13q23)									1	
der(10)del(10)(q11)								1		
der(10)del(10)(q21)			1	1						
der(10)del(10)(q22)										1
der(10)del(10)(q23)						1				
der(10)del(10)(p12,q22)				1						
der(10)t(10,X)(q22->p11,p11->pter)				1						
der(10)t(3,10)(q21,q23)										1
der(10)t(3,10)(q24,q21)del(10)(p12)						1				
der(10)t(3,10)(q24,q22)						1				
der(10)t(10,11)(q11,q14)								1		
der(10)t(10,13)(p11,q21)										1
der(10)del(10)(q22)t(10,13)(p11,q21)										1
<b>der(11)</b>	2	0	0	0	1	1	3	1	1	0
der(11)del(11)(pter->q13)		1								
der(11)del(11)(pter->q22)		1								
der(11)del(11)(p11q14)				1						
der(11)del(11)(p11q23)									1	
der(11)del(11)(p12,q22)			1							
der(11)del(11)(p12->qter)	1									
der(11)del(11)(p11q22)					1					
der(11)del(11)(p11)										1
der(11)del(11)(p14)								1		
der(11)del(11)(p14->qter)		1								
der(11)del(11)(q12)						1				
der(11)t(4,11)(p13,p12)del(11)(q22)			1							
der(11)t(11,X)(p11->q14,q25)				1						
der(11)t(11,13)(p11q14,q31)				1						
der(11)t(11,13)(p11,q21)				1						
der(11)t(11,19)(p11,q13.1)					1				1	
der(11)dup(11)(pter->q22::p14->pter)			1							
<b>der(12)</b>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	3
der(12)del(12)(pter->q23)		1	1							
der(12)del(12)(p12->q23)		1								
der(12)del(12)(p11)							1	1		2
der(12)del(12)(p12)				1				1		
der(12)del(12)(p13)				1						
der(12)del(12)(p11->qter)	2			1						
der(12)del(12)(p11->q23)		2	1							
der(12)del(12)(p11q22)									1	
der(12)del(12)(q21)										

der(12)del(12)(q23)					1		1			1
der(12)t(3,12)(p14,p12)				1						
der(12)(qter->q21::p11.2->qter)						1				
<b>der(13)</b>	2	2	1	3	2	6	1	2	0	0
der(13)del(13)(p11->qter)		1								
der(13)del(13)(q21)			1							
der(13)t(13,21)(p11,q21)					1					
der(13)t(13,16)(q12,q11)					1					
der(13)t(13:13)(p11q14)									1	
der(13)dup(13)(pter->qter::qter->q14)							1			
<b>der(14)</b>	0		2	1	1	1	1	1	2	0
der(14)del(14)(pter->q21)		1								
der(14)t(14,14)(q12->pter::q21->qter)	1									
der(14)del(p11,q22)	1									
der(14)t(14,14)(q21->pter::q21->qter)	1									
der(14)del(q11,q22->q31)	1									
der(14)del(q11,q22)	1									
der(14)del(14)(q23)				2						
der(14)del(14)(q24)								1	1	3
der(14)del(14)(q11q21)		3								
der(14)i(14)(qter->cen::cen->qter)						1				
<b>der(15)</b>	2	2	0	0	1	3	1	0	1	0
der(15)del(15)(q21)								1		
der(15)del(15)(q22)				2		1				
der(15)del(15)(q23)			1					2		
der(15)t(13,15)(q21,p11)del(15)(q22)				1						
der(15)i(15)(q22->cen::cen->q22)						2				
<b>der(16)</b>	2	0	3	0	2	1	1	0	3	2
der(16)del(16)(p13)							1			1
der(16)del(16)(p12,q12)	1									
der(16)dup(16)(pter->q23::p11->pter)			1							
der(16)(qter->q12::qter->p11::q11->qter::q12->qter)			1							
der(16)del(16)(p11)				3					1	
der(16)del(16)(p11->qter)		4	2							
der(16)del(16)(q13)									1	
der(16)t(14,16)(q31,p13)									1	
der(16)i(16)(qter->q12::p11->qter)										1
<b>der(17)</b>	2	0	2	0	0	1	0	3	0	2
der(17)del(17)(p11->qter)		2	1	1	1					
der(17)(qter->q21::p11->q22::q21->qter)	1									
der(17)(qter->q21::p11->q22)	1									
der(17)del(7)(p12q12)								1		
<b>der(18)</b>	2	2	1	1	1	3	1	2	2	4
der(18)del(18)(q21)						2				
der(18)i(18)(p11)										2

<b>der(19)</b>	1	0	1	1	1	4	0	3	1	2
der(19)del(19)(p11q12)				1						
der (19)del(19)(pter->q13)		2								
der(19)(qter->pter::pter->qter)	2									
der(19)dup(19)(pter->qter::q11->qter)	1									
der(19)t(15,19)(q21,q13)							1			
der(19)t(13,19)(q14,q11)										1
<b>der(20)</b>	0	1	2	1	0	0	0	1	0	1
der(20)dup(pter->qter::q11->qter)	1									
der(20)t(1,20)(q32,p11)			1							
<b>der(21)</b>	0	2	1	2	2	1	0	1	2	1
der(21)dup(21)(pter->qter::q11->qter)	1									
der(21)del(21)(q21)				1						
der (21)del(21)(p11->qter)		1								
der(21)iso(21)(q)		1								
der(21)t(13,21)(q31,p11)					1					
der(21)i(21)(q)			1							
der(21)dup(21)(pter->qter::q11->qter)	2									
<b>der(22)</b>	2	3	2	1	1	4	0	3	3	2
der(22)t(1,22)(q12->q24,p11.2)					1					
der(22)t(7,22)(q21,q11)								1		
der(22)i(22)(p12)							1			
<b>der(X)</b>	0	3	0	2	0	0	0	2	0	1
der(X)del(X)(p11)				1			2	1		1
der(X)del(X)(q11)								3		
der(X)del(X)(q22)					1			1		
der(X)del(X)(p11.3q21)									1	
der(x)t(15,X)(q21,p11)				1						

<b>Zusammenfassung Patientin 7</b>	Met0 1	Met0 5	Met0 6	Met0 7	Met0 8	Met0 9	Met1 1	Met1 2	Met1 3	Met1 4
<b>der(1)</b>	0	0	1	1	2	1	2	0	1	1
der(1)del(1)(p11)			3							
der(1)del(1)(p21)	1									
der(1)del(1)(p22q21)						2				
der(1)del(1)(q11)				1						
der(1)del(1)(q12)								1		
der(1)t(1;5)(p11;p11)									1	
der(1)t(1;5)(p11;p11)del(1)(q32)										1
der(1)t(1;10)(p32;q11.2)del(1)(q32)	1									
der(1)t(1;11)(p13;q13)										1
der(1)t(1;12)(p34;q24.1)								1		
der(1)t(1;14)(q31;q24)		1								
<b>der(2)</b>	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0
der(2)del(2)(p11)								1		

der(2)del(2)(p12)		2								
der(2)del(2)(q11)								1	2	
der(2)del(2)(q31)										1
der(2)t(2;22)(p11;q11)				1						
der(2)t(2;3)(q32;p21)									1	
<b>der(3)</b>	0	1	0	4	1	1	2	0	1	0
der(3)del(3)(p12)								1		
der(3)del(3)(p12q22)		1								
der(3)del(3)(p14)			1							
der(3)del(3)(p21.3)									1	1
der(3)del(3)(p21p12)			2							
der(3)del(3)(p21q13.1)								1		
der(3)del(3)(p21q22)	1									
der(3)del(3)(p22q22)	1									
der(3)del(3)(p24q22)		1								
der(3)del(3)(q11.2)								1		
der(3)del(3)(q26.1)				1	1					
der(3)del(3)(q21)						2				
<b>der(4)</b>	0	1	1	1	2	1	2	1	1	1
der(4)del(4)(q12)			1							
der(4)del(4)(q13)									1	
der(4)del(4)(q26)								1		
der(4)del(4)(q28)			1							
der(4)t(1;4)(p13;q35)				1						
der(4)t(1;4)(q32;q21)									1	
der(4)t(3;4)(p21;q28)									1	
<b>der(5)</b>	0	0	0	0	2	2	1	1	1	1
der(5)del(5)(p14q11)			1							
der(5)del(5)(p15q31)	1									
der(5)del(5)(q11)			1							
der(5)del(5)(q23)			1							
der(5)del(5)(q31)	1									
der(5)del(5)(q33)							1			
der(5)t(3;5;X)(p14p26;p14;p11.2)		1								
der(5)t(5;6)(p11;p11)del(5)(q23)			1							
der(5)t(5;20)(q23;q11.2)									1	
<b>der(6)</b>	0	2	1	2	2	2	4	3	1	1
der(6)del(6)(p12q12)				1						
der(6)del(6)(q24)	1									
der(6)i(6)(q)				1						
<b>der(7)</b>	0	0	0	1	2		2	1	1	1
der(7)del(7)(p12)						1				
der(7)del(7)(p12q31)			1							
der(7)del(7)(p13q22)								1		
der(7)del(7)(p21q21)			1							
der(7)del(7)(q11.2)	1									
der(7)del(7)(q21)		1						1		
der(7)del(7)(q31)									1	

<b>der(8)</b>	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1
der(8)del(8)(p21)	1									
der(8)del(8)(p21q22)	1									
der(8)del(8)(q11)								1		
der(8)del(8)(q13)				1						
<b>der(9)</b>	0	1	1	0	2	1	1	0	0	1
der(9)del(9)(p12q13)	1			2					3	
der(9)del(9)(p22q21)			1							
der(9)del(9)(p13)		2					1	2		
der(9)del(9)(p13q13)		1								
der(9)del(9)(q12)			1							
der(9)del(9)(q13)				1		2				
der(9)del(9)(q31)	1									
der(9)t(9;21)(q13;q11)del(9)(p12)									1	
<b>der(10)</b>	0	1	0	3	2	0	1	1	2	1
der(10)del(10)(p11)	1									
der(10)del(10)(p11.2)			1							
der(10)del(10)(p12)				1						
der(10)del(10)(q22)						2				
der(10)del(10)(q23)									1	
der(10)t(10;20)(q24;p11.2)			1							
<b>der(11)</b>	1	1	1	0	1	1	2	1	0	0
der(11)del(11)(p11.2)				1	2					
der(11)del(11)(p11q13)		1								
der(11)del(11)(p11q22)									1	
der(11)del(11)(p11q23)		1	3	2						
der(11)del(11)(p13)		1								
der(11)del(11)(q22.2)	1								1	
der(11)idic(11)(q22.2)	1									
der(11)idic(11)(q22.2)del(11)(p14)	1									
<b>der(12)</b>	0	2	1	0	2	0	1	2	1	1
der(12)del(12)(p11.2)	1						1			
der(12)del(12)(p11.2q21)	1									
der(12)del(12)(p11.2q22)				1						
der(12)t(5;12)(p11;q24.1)									1	
der(12)del(12)(q12)						2				
der(12)del(12)(q24.1)						1				
<b>der(13)</b>	2	2	3	1	2	3	1	1	2	0
der(13)del(13)(q12)								2		
der(13)del(13)(q22)		1								
der(13)t(6;13)(p12;p11)							1			
<b>der(14)</b>	1	0	0	1	2	2	2	0	1	0
der(14)del(14)(q11.2)		1								
der(14)del(14)(q13)			2	1						
der(14)del(14)(q22)			1							

der(14)del(14)(q24)	2									
der(14)i(14)(q24)	1									
der(14)t(2;14)(p23;q21)			1							
der(14)t(12;14)(q12;q13)del(12)(q21)				1						
<b>der(15)</b>	0	2	2	2	3	2	2	1	1	1
der(15)i(15)(q22)	1									
<b>der(16)</b>	1	0	0	0	2	2	2	2	2	0
der(16)del(16)(p11)			2							
der(16)del(16)(p11.2)		1		1						
der(16)del(16)(p12)		1								
der(16)del(16)(q11.2)									1	
der(16)del(16)(q12.1)	2								1	1
der(16)t(1;16)(p36.1;p12)del(16)(q12.1)									1	
<b>der(17)</b>	0	1	1	0	0	0	2	2	0	1
der(17)del(17)(p11)			1		3	4				
der(17)t(10;17)(p11;p11)		1								
der(17)t(10;17)(q24;p11.2)							1			
der(17)i(q)						1				
<b>der(18)</b>	0	1	0	1	1	1	2	2	1	0
der(18)del(18)(p11)	1									
der(18)t(18;22)(q21.1;q11.2)				1						
<b>der(19)</b>	2	1	1	0	3	4	2	3	2	0
der(19)del(19)(q13.1)				1						
<b>der(20)</b>	2	2	1	1	2	0	0	0	1	2
<b>der(21)</b>	1	2	0	0	2	2	2	2	2	0
der(21)dup(21)(q11q22)			1							
der(21)t(10;21)(q22;q22)			1							
der(21)t(21;22)(p11;q11)	1									
<b>der(22)</b>	1	2	2	1	2	2	2	1	1	0
der(22)t(2;22)(p23;p11)								1		
der(22)t(15;22)(q11;p13)									1	
<b>der(X)</b>	1	1	0	1	1	0	2	0	1	1
der(X)del(X)(p11q21)			1							
der(X)del(X)(p11.2)				1	1	2				
der(X)del(X)(p21)					1					
der(X)del(X)(q12)								1		

<b>Zusammenfassung Patientin 8</b>	Met0 2	Met0 6	Met 7	Met 8	Met 9	Met1 0	Met1 1	Met1 6	Met1 8
<b>der(1)</b>	1	3	0		1	1	1	2	1
der(1)del(1)(p32q21)	1								



der(1)del(1)(p31q31)					3				
der(1)del(1)(q25)					1				
der(1)del(1)(p22)		1							
der(1)del(1)(p22q32)					1				
der(1)del(1)(q11)						1			
der(1)del(1)(q12)	1								
der(1)del(1)(q21)			2						
der(1)t(1;14)(q21;q11)					1				
der(1)del(1)(q22)									1
<b>der(2)</b>	1	2	0		2	1	1	1	2
der(2)ins(2;10)(p13q21;p12q22)									1
der(2)del(2)(p21q32)						1			
der(2)del(2)(p21q33)								1	
der(2)del(2)(q21)			1						
der(2)del(2)(q13)								1	
der(2)del(2)(q14)									2
<b>der(3)</b>	5	3	3		0	2	1	2	3
der(3)del(3)(p21)	3	2			2		1	1	
der(3)del(3)(p21q25)	2								
der(3)del(3)(p12)					1				
der(3)del(3)(q21)			1						
der(3)ins(1;3)(p22pter;q26)del(3)(p21)					1				
der(3)del(3)(p21q21)							1		
<b>der(4)</b>	3	2	0		1	2	2	1	2
der(4)del(4)(p14q25)			1						
der(4)del(4)(q13)								1	
<b>der(5)</b>	0	2	2		0	4	2	2	0
der(5)del(5)(p13)			1						
der(5)del(5)(p12)								1	
der(5)del(5)(q11)								1	
der(5)del(5)(q14)			1						
der(5)del(5)(q22)		1							
der(5)del(5)(q31)					2				
<b>der(6)</b>	5	0	2		1	0	2	0	1
der(6)del(6)(p21)	1								
der(6)del(6)(p11)					1				
der(6)del(6)(p11q21)					1				
der(6)del(6)(q14)	1							2	
der(6)del(6)(q21)								1	
<b>der(7)</b>	3	1	2		0	1	0	0	1
der(7)t(7;14)(p22;q22)						1			
der(7)del(7)(p14q32)						1			
der(7)del(7)(p14q22)					1				
der(7)del(7)(p12q21)							1		
der(7)del(7)(p12q11)							1		
der(7)del(7)(q11)			1			1			

der(7)del(7)(q21)							1		
der(7)del(7)(q32)	1					1			
<b>der(8)</b>	2	1	4		2	2	2	2	1
der(8)del(8)(p12)			1						
der(8)del(8)(p12q21)						1			
der(8)del(8)(p12q22)			1						
der(8)del(8)(q13)	1		1						
der(8)del(8)(q22)		1							1
<b>der(9)</b>	0	1	1		2	0	2	2	0
der(9)del(9)(p13)									1
der(9)del(9)(p12)							1		
der(9)del(9)(q22)						1	1		
<b>der(10)</b>	4	1	5		2	1	2	1	3
der(10)del(10)(p14q21)	1								
der(10)del(10)(p11)							1		
der(10)del(10)(p11q22)	1								
der(10)dup(10)(q11qter)			2						
der(10)i(10)(q)					1				
der(10)del(10)(q21)								1	1
der(10)del(10)(q22)	1							1	
der(10)del(10)(q23)	1								
<b>der(11)</b>	0	1	1		0	2	1	3	3
der(11)del(11)(p14)	2								
der(11)del(11)(q12)		1					3		
der(11)del(11)(q23)					2			1	
<b>der(12)</b>	2	1	1		2	4	2	0	3
der(12)ins(10;12)(p11q22;p13q22)						1			
der(12)del(12)(p12)	1								
der(12)del(12)(q22)	1							1	
<b>der(13)</b>	4	2	0		2	1	2	2	4
der(13)dup(13)(q11qter)			1						
der(13)t(13;16)(q21;q11)					1				
der(13)t(5;13)(p11;q21)									1
der(13)del(13)(q22)			2		1	1			
<b>der(14)</b>	1	3	3		0	1	2	2	1
der(14)i(14)(q)									2
<b>der(15)</b>	1	0	2		1	2	1	2	2
der(15)del(15)(q22)						1	1		
der(15)t(14;15)(q21;q24)					1				
<b>der(16)</b>	3	2	5		2	2	3	2	0
der(16)t(4;16)(p14;p12)					1				
der(16)del(16)(p12)								1	
der(16)del(16)(p11)			1						
der(16)dup(16)(q11qter)			1						

der(16)del(16)(q22)	3								
<b>der(17)</b>	2	0	1		2	0	1	3	2
der(17)del(17)(p11)	1								
der(17)t(17;19)(p11;p12)								1	
der(17)del(17)(q25)	1								
<b>der(18)</b>	3	0	1		2	1	2	2	1
der(18)del(18)(p11)	1		1						
der(18)del(18)(q11)					1				
der(18)del(18)(q21)					1				
<b>der(19)</b>	2	3	1		4	1	2	0	1
der(19)del(19)(p13)							1		
der(19)t(19;21)(p13;q11)	1								
<b>der(20)</b>	0	1	2		0	2	0	1	0
<b>der(21)</b>	2	2	3		2	2	0	1	1
der(21)t(14;21)(q11q23;p11)			1						
<b>der(22)</b>	5	2	1		2	2	2	0	2
der(22)t(21;22)(p11;q11)	1								
<b>der(X)</b>	1	3	1		0	2	0	0	1
der(X)del(X)(p11)							1		
der(X)del(X)(q11)			1						

<b>Zusammenfassung Patientin 9</b>	Met0 2	Met0 3	Met0 4	Met0 5	Met0 6	Met0 7	Met0 8	Met1 2	Met1 3	Met1 5
<b>der(1)</b>	0	2	1	2	1	2		2	2	2
der(1)del(1)(p32)			2							1
der(1)del(1)(p13)			1							
der(1)del(1)(q21)					1					
der(1)del(1)(q31)									1	
<b>der(2)</b>	1	1	2	1	0	2		1	2	0
der(2)del(2)(p16)	1									
der(2)del(2)(q33)										1
<b>der(3)</b>	2	2	4	1	1	2		2	2	2
der(3)del(3)(p21)		1								2
der(3)del(3)(p21q25)										1
der(3)del(3)(p21q24)			1							
der(3)del(3)(q11)								1		
der(3)del(3)(q13)					1					
<b>der(4)</b>	1	1	0	2	2	1		2	1	1
der(4)t(4;10)(p13;p12.2)	1									

der(4)t(4;8)(p11q24;p12q22)						1				
der(4)del(4)(q26)			1							
der(4)t(3;4)(p11;qter)									1	
<b>der(5)</b>	1	0	1	2	1	2		2	2	2
der(5)del(5)(p11q31)								1		
der(5)del(5)(q23)				2						
<b>der(6)</b>	2	2	2	2	1	2		2	2	2
der(6)del(6)(p10)	1									
der(6)del(6)(q14)					1					
<b>der(7)</b>	0	0	1	1	2	1		2	2	1
der(7)del(7)(q11.2)	1									
der(7)del(7)(q21)				1						
der(7)del(7)(q31)								1		
der(7)del(7)(q32)		1								
<b>der(8)</b>	2	2	3	2	1	1		2	2	2
<b>der(9)</b>	2	2	2	3	2	1		2	2	2
der(9)del(9)(p13)									1	
der(9)del(9)(q11)				1						
der(9)del(9)(q13)				3						
<b>der(10)</b>	3	2	3	2	2	2		2	2	1
der(10)del(10)(p13q22)		1								
der(10)del(10)(q11)		1								
der(10)dup(10)(q11qter)					1					
der(10)del(10)(q22)										2
<b>der(11)</b>	2	1	1	2	1	0		2	1	1
der(11)del(11)(p13)				1		1				
der(11)del(11)(p12)					1					
der(11)del(11)(p11)					2					1
der(11)del(11)(q11)					1					
der(11)del(11)(q13)			1							
der(11)del(11)(q14)				1						
der(11)del(11)(q22)						1				
<b>der(12)</b>	2	2	1	2	2	0		1	2	1
der(12)del(12)(p11)						1				
der(12)del(12)(q23)								1		
<b>der(13)</b>	3	2	2	2	2	2		1	1	2
der(13)t(13;19)(p11;q12)									1	
der(13)i(13)(q)									1	
der(13)del(13)(q21)								1		
<b>der(14)</b>	2	0	2	1	2	1		2	2	2
der(14)del(14)(q22)						1				
<b>der(15)</b>	2	4	2	2	2	1		0	2	2

der(15)dup(15)(q21qter)		1								
<b>der(16)</b>	3	2	1	1	2	1		1	2	1
der(16)del(16)(p12)	1									
der(16)del(16)(q11)	1									
der(16)del(16)(q12)	1			1				1		
<b>der(17)</b>	0	0	2	0	2	1		2	2	2
der(17)del(17)(q21)						1				
<b>der(18)</b>	1	1	2	1	2	2		2	2	2
der(18)del(18)(q21)	1									
<b>der(19)</b>	2	4	2	3	1	1		2	1	0
<b>der(20)</b>	2	0	1	1	1	1		0	0	1
<b>der(21)</b>	1	0	2	0	1	2		2	1	0
der(21)dup(21)(q11qter)	1									
<b>der(22)</b>	0	4	2	1	2	1		3	1	2
der(22)t(11;22)(q12;p11)									1	
<b>der(X)</b>	1	0	1	0	0	0		0	2	0
der(X)del(X)(p11)		1		1	1	1				
der(X)del(X)(q13)					1					
der(X)del(X)(q22)										1
der(X)del(X)(q23)								1		

## 9. Danksagung

Zu aller Erst möchte ich mich herzlich bei Dr. rer. nat. Jörg Weimer für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken. In vielen Stunden bekam ich Unterstützung bei labortechnischen Schwierigkeiten und Fragen zur Auswertung.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Außerdem möchte ich mich insbesondere bei Regina Fredrick und Doris Karow für die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei meinen labortechnischen Anfängen bedanken, sowie für die Durchführung der vielen benötigten Zellkulturen und Bereitstellung entsprechend vorbereiteter Proben.

Des Weiteren möchte ich mich sowohl bei Prof. Dr. med. Dr. h.c. Walter Jonat und Prof. Dr. med. Nicolai Maass für die Bereitstellung der Einrichtungen des Onkologischen Labors bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei den Menschen bedanken, welche mich tagtäglich durch das Studium begleitet haben. Vor allem meinem Mann Tim Rohwer für die jahrelange emotionale Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Außerdem meiner Familie wobei insbesondere meine Eltern und Großeltern durch beharrliches Nachfragen, wann man mich denn offiziell „Frau Doktor“ nennen dürfte, es schafften mich auch in schwierigen Zeiten zum Durchhalten und Weitermachen zu ermutigen.

Vielen Dank!

## 10. Curriculum Vitae

Name: Fenja Rohwer  
geborene Harrs  
Geburtsdatum: 14.02.1991  
Geburtsort: Kiel

### **Schulausbildung**

---

1997 bis 2001 Grundschole Wattenbek  
2001 bis 2010 Alexander-von-Humboldt-Schole Neumünster

Schulabschluss Juli 2010 Abschluss des Abiturs mit einem  
Gesamtdurchschnitt von 1,1

### **Studium**

---

Seit Oktober 2010 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
2010 bis 2012 Absolvierung von drei Pflegepraktika à 30 Tage im  
Städtischen Krankenhaus Kiel (Viszeralchirurgie),  
Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster  
(Intensivstation), UKSH Kiel (Neuro-Pädiatrie)  
September 2012 Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen  
Prüfung mit der Note -Gut-  
Februar 2013 Beginn einer experimentellen Promotionsarbeit im  
Onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie  
und Geburtshilfe am UKSH

## **Famulaturen**

	Internistische Aufnahmestation Städtisches Krankenhaus Kiel
	Interdisziplinäre Notaufnahme FEK Neumünster
	Notfallambulanz, Klinik für Neurologie, UKSH Kiel
	Onkologisches Labor, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH Kiel
	Anästhesiologie, Lubinus Clinicum Kiel
	Infektionsmedizin und Geburtshilfe Hospital José Cayetano Heredia Piura, Peru, im Rahmen eines studentischen Austausches
Oktober 2015	Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note -Gut-
November 2015	Beginn des 1. Tertials des Praktischen Jahres in der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel.
7. März 2016	Beginn des 2. PJ-Tertials in der Klinik für Chirurgie des Friedrich-Ebert-Krankenhauses in Neumünster.
27. Juni 2016	Beginn des 3. PJ-Tertials in der Klinik für Innere Medizin der Inland Klinik Rendsburg.
16.Oktober 2016	Ende des Praktischen Jahres
3.November 2016	Abschluss des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note - Sehr gut - und in der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote - Gut (1,66) –
4.November 2016	Erteilung der Approbation als Ärztin



1.Dezember 2016

Arbeitsbeginn als Weiterbildungsassistentin in der  
Klinik für Anästhesiologie und Operative  
Intensivmedizin am UKSH Campus Kiel.

### **Nebenberufliche Tätigkeiten**

---

2011-2013

Studentische Aushilfe im Bereich Empfang und  
Reisekostenabrechnung bei der Designa  
Verkehrsleittechnik GmbH

2014-2015

Pflegehelferin beim Ambulanten Pflegedienst des  
Kieler Stadtklosters im externen Nachtdienst

### **Zusatzqualifikationen**

---

Ausbildung zum Rettungssanitäter, Sprachkenntnisse in Englisch und Französisch  
sowie Spanisch auch in der medizinischen Praxis, Ausbildung zum Gruppenführer  
und Ausbilder Ortung/Rettungshunde beim Technischen Hilfswerk.

### **Publikation**

---

*Evidence for Predictive Markers of Platinum Effectiveness in Ovarian Carcinoma by  
Microarraybased Comparative Genomic Hybridization.*

Rohwer F<sup>1</sup>, Hedemann N<sup>1</sup>, Stope MB<sup>2</sup>, Mustea A<sup>3</sup>, Hilpert F<sup>4</sup>, Bauerschlag DO<sup>5</sup>,  
Maass N<sup>5</sup>, Arnold N<sup>1</sup> and Weimer J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Oncology Laboratory, University Hospital of  
Schleswig-Holstein, Christian-Albrechts University Kiel, Germany

<sup>2</sup>Cancer Laboratory, Department of Urology, University Medicine Greifswald, Germany

<sup>3</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, University Medicine Greifswald, Germany

<sup>4</sup>Jerusalem Hospital, Breastcancer Center Hamburg, Germany

<sup>5</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital of Schleswig-Holstein,  
Christian-Albrechts University Kiel, Campus Kiel, Germany

In: *Current Opinion in Gynecology and Obstetrics* (Accepted: Mar 29, 2018;

Published: April 02, 2018). Online verfügbar unter

<http://www.gratisoa.org/journals/index.php/COGO/article/view/1010>

## **Vorträge**

---

Poster-Vortrag am 10./11.11.2016 in Düsseldorf beim 8. Wissenschaftlichen Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (TraFo Symposium der AGO 2016):

Poster-Nummer: 6.1

*Einige der häufigsten, wiederkehrenden Chromosomenveränderungen in Ovarialkarzinomen könnten die Wirksamkeit von Platintherapien differenzieren.*

Fenja Rohwer <sup>1</sup>, Jörg Weimer <sup>1</sup>, Nina Hedemann <sup>1</sup>, Dirk-Olaf Bauerschlag <sup>1</sup>, Nicolai Maass <sup>1</sup>, Norbert Arnold <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## **Förderung**

---

Die vorgelegte experimentelle Doktorarbeit wurde studienbegleitend angefertigt und von der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel freundlicherweise für ein Semester durch ein Promotionsstipendium unterstützt.

### **Versicherung an Eides statt**

Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig verfasst und mich keiner anderen  
als der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient.